



Funcionalização de filmes de polidopamina com lacase e nanopartículas semicondutoras – Aplicação em biossensores

Luís Miguel Camacho Caldeira de Almeida

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Ana Pimenta da Gama Silveira Viana Semedo
Jorge Manuel Palma Correia

Agradecimentos

É com a maior sinceridade que gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho de Mestrado.

Em particular agradeço à minha orientadora Dra. Ana Viana por todos os conselhos, motivação, confiança e amizade transmitidos ao longos destes meses, assim como ao meu co-orientador Dr. Jorge Correia por todas as sugestões, discussões e contribuições que permitiram aperfeiçoar este trabalho. Obrigado a ambos por me darem a oportunidade de envergar pela investigação científica, que tanto gosto, e por me incutirem todas as bases necessárias. Foi com o maior prazer e orgulho que trabalhei segundo as vossas orientações.

A todos os restantes membros do Grupo de Eletroquímica Interfacial, pela grande disponibilidade em ajudar e boa companhia no laboratório, em especial, agradeço ao Rui e à Inês “pequena” pelos momentos descontraídos tão necessários para contrariar as alturas mais difíceis. Um especial obrigado ao Dr. Joaquim Marquês e à Dra. Inês Almeida pelos conselhos e sábios auxílios. À Dra. Virgínia Ferreira pela companhia, pela disponibilidade para discussões ou explicações úteis e claro pelas deliciosas bolachas de milho. Ao trio da porta do lado, Joel, Jorge e Beatriz pela amizade e grande espírito de equipa. Ao Telmo pelo companheirismo e amizade, e à Dra. Olinda Monteiro pela simpatia e preocupação.

À Dra. Maria de Deus Carvalho, do Grupo do Estado Sólido, pela generosa participação e síntese das nanopartículas de magnetite essenciais ao sucesso dos resultados.

À Prof.^a Alessandra Morana, Francesco Cara e Guiseppe Squillaci do *Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale* (IBAF) situado em Nápoles, Itália, pertencente ao centro I&D *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (CNR), pelo fornecimento e caracterização do preparado de lacase comercial da Novozymes.

Ao grupo de indivíduos do piso de cima, em especial à Joana, por toda a companhia, amizade, apoio e diversão dos últimos tempos.

Por último e não menos importante, quero agradecer à família sesimbrense, em especial ao Diogo, por todo o apoio, afeto e ânimo prestados. Aos meus queridos pais, insubstituíveis, pela força, confiança e afeto depositados em mim ao longo dos anos.

Obrigado a todos.

Resumo

Justificado pelo crescente interesse na detecção, quantificação ou eliminação de compostos fenólicos por biossensores enzimáticos, o presente trabalho aborda a otimização da atividade catalítica de superfícies de carbono modificadas com filmes de polidopamina (PDA) sintetizados química- ou electroquimicamente, lacase (Lac) e nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4 -NPs). Recorrendo a diversas arquiteturas de eléctrodo testou-se a versatilidade e compatibilidade dos filmes de polidopamina enquanto plataformas imobilizadoras, comprovou-se a atividade catalítica de lacase imobilizada e demonstraram-se propriedades eletroquímicas das nanopartículas de magnetite.

Primeiramente, um estudo exaustivo das propriedades de filmes de polidopamina formada espontaneamente sobre carbono vítreo (GC) foi levado a cabo por elipsometria, goniometria de ângulos de contacto, microscopia de força atómica (AFM) e voltametria cíclica (CV). Medições elipsométricas *ex-situ* de filmes crescidos durante 1, 8 e 14 horas complementadas por imagens topográficas de AFM, comprovaram o aumento da espessura (3 ± 1 ; 8 ± 1 e 11 ± 2 nm) com o aumento do tempo de polimerização. Em termos morfológicos observou-se um ligeiro decréscimo da rugosidade com o tempo de polimerização ($R_q = 3,56$; $2,54$ e $2,77$ nm), evidenciando o crescimento de filmes uniformes que reproduzem a rugosidade do GC de partida ($R_q = 4,36$ nm). Após estabilização da resposta eletroquímica, comprovou-se a presença de grupos quinona/hidroquinona (Q/HQ) imobilizados, estimando recobrimentos superficiais comparáveis entre 1h ($2,20\times 10^{-11}$ mol·cm⁻²), 8h ($3,03\times 10^{-11}$ mol·cm⁻²) e 14 horas ($3,86\times 10^{-11}$ mol·cm⁻²) de crescimento espontâneo, o que corrobora com a hidrofilicidade semelhante dos mesmos ($\theta_c \approx 48^\circ$). Preliminarmente, eletrossintetizou-se polidopamina (ePDA) a diferentes velocidades de varrimento de potencial (20, 50, 100 e 200 mV·s⁻¹) obtendo-se em menos de 3,5 minutos recobrimentos superficiais de Q/HQ (3×10^{-11} mol·cm⁻²) comparáveis a um filme formado espontaneamente por 8 horas. Tendo em conta o efeito bloqueador da resposta faradaica das espécies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em eléctrodos GC/PDA e GC/ePDA, prosseguiu-se com o uso dos filmes mais finos para imobilizar lacase e nanopartículas de magnetite.

Superfícies de grafite previamente cobertas com filmes de PDA, foram modificadas com lacase graças ao ambiente biomimético superficial proporcionado pelo polímero. A atividade catalítica de eléctrodos grafite/PDA/Lac e grafite/ePDA/Lac foi determinada amperometricamente com recurso ao substrato modelo ABTS, resultando em K_M iguais a $35,5$ μM e $19,8$ μM , respetivamente. Em seguida, filmes de PDA modificados com PDA@NPs revelaram uma sensibilidade maior na detecção amperométrica do ABTS (17 mA·M⁻¹·cm⁻²) comparativamente com eléctrodos de grafite ou grafite/PDA (5 - 7 mA·M⁻¹·cm⁻²). Após modificação e imobilização de Fe_3O_4 -NPs com lacase e PDA (Lac&PDA@NPs), altos valores de afinidade foram atingidos ($K_M = 1,0$ μM) com correntes de saturação baixas ($j_{\text{max}} = 1,8$ $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Por fim, e maximizando a quantidade de material catalítico imobilizado pela espontaneidade da polimerização conjunta de dopamina, lacase e Lac&PDA@NPs, preparou-se um eléctrodo modificado com alta sensibilidade na detecção de ABTS ($1,04$ A·M⁻¹·cm⁻²; 1 - 15 μM), indicando a grande potencialidade desta arquitetura de eléctrodo na futura detecção de compostos fenólicos.

Palavras-chave: polidopamina, biossensor, lacase, nanopartículas de magnetite.

Abstract

The detection, quantification or elimination of phenolic compounds by enzymatic biosensors is a research topic with increasing interest. To address this current demand, an optimization of the catalytic activity of carbon surfaces modified with chemically or electrochemically synthesized polydopamine films (PDA), laccase (Lac) and magnetite nanoparticles (Fe_3O_4 -NPs) was employed. Through the use of multiple electrodes designs, the versatility and compatibility of polydopamine films were tested, as well as the catalytic activities of immobilized laccase and electrochemical properties of magnetite nanoparticles.

First, a complete study was carried out by ellipsometry, contact angle goniometry, atomic force microscopy (AFM) and cyclic voltammetry (CV), revealing the properties of spontaneously formed polydopamine films grown on glassy carbon (GC). *Ex-situ* ellipsometric measurements of 1, 8 and 14 hours PDA films, showed an increase in thickness over time (3 ± 1 ; 8 ± 1 e 11 ± 2 nm) which was corroborated with AFM topographic images. A slight decrease in roughness was observed as polymerization time increases ($R_q = 3.56$; 2.54 e 2.77 nm), showing the growth of uniform films that reproduce the GC's starting roughness ($R_q = 4.36$ nm). The presence of quinone/hydroquinone groups (Q/HQ) was proved by CV after stabilization of electrochemical response, estimating comparable surface coverages between 1, 8 and 14 hours (2.20×10^{-11} ; 3.03×10^{-11} ; 3.86×10^{-11} mol $\cdot\text{cm}^{-2}$) of spontaneous growth, which agrees with the similar wetting properties of the PDA films ($\theta_c \approx 48^\circ$). Preliminarily results of electrosynthesized polydopamine (ePDA) were obtained at different potential scan rates (20, 50, 100 e 200 mV $\cdot\text{s}^{-1}$) achieving comparable Q/HQ coverages (3×10^{-11} mol $\cdot\text{cm}^{-2}$) with PDA film formed in 8 hours, in less than 3.5 minutes. Regarding the blocking effect of faradaic response on GC/PDA and GC/ePDA electrodes, thinner films were used in the laccase and Fe_3O_4 -NPs immobilization step.

Graphite surfaces previously coated with PDA films were modified with laccase due to the surface biomimetic environment provided by the polymer. The catalytic activity of graphite/PDA/Lac and graphite/ePDA/Lac electrodes was determined by amperometric measurements of ABTS as substrate model, where K_M values of 35.5 and 19.8 μM were fitted respectively. Then, PDA films modified with PDA@NPs revealed a higher sensitivity towards ABTS detection (17 mA $\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) compared to graphite or graphite / PDA electrodes (5-7 mA $\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). After modification and immobilization of Fe_3O_4 -NPs with laccase and PDA (Lac&PDA@NPs), a high affinity was achieved ($K_M = 1.0$ μM) with low saturation currents ($j_{\text{max}} = 1.8$ $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Finally, this problem was solved maximizing the amount of immobilized catalytic material in a spontaneous co-polymerization of dopamine, laccase and Lac&PDA@NPs. The modified electrode showed a high sensitivity towards ABTS detection (1.04 A $\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$; 1-15 μM) denoting the great potential of this electrode architecture in the future detection of phenolic compounds.

Key-words: polydopamine, biosensor, laccase, magnetite nanoparticles.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice de tabelas	vii
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	xiii
Símbolos	xiv
1. Introdução.....	1
1.1. Detecção de compostos fenólicos por biossensores enzimáticos.....	1
1.2. Polidopamina como plataforma funcional bio-inspirada	4
1.3. Propriedades e aplicações das nanopartículas de magnetite.....	6
1.4. Objetivos e organização da dissertação.....	8
2. Detalhes experimentais	11
2.1. Reagentes	11
2.2. Materiais de eletrodo e células eletroquímicas.....	11
2.3. Procedimentos	13
2.3.1. Limpeza das superfícies grafíticas	13
2.3.2. Síntese de nanopartículas de magnetite (Fe ₃ O ₄).....	13
2.3.3. Modificação das superfícies com PDA, Lacase e Fe ₃ O ₄ -NPs	14
2.4. Técnicas de Caracterização	15
2.4.1. Elipsometria	15
2.4.2. Goniometria de Ângulo de Contacto.....	19
2.4.3. Microscopia de Força Atómica	20
2.4.4. Voltametria Cíclica e Cronoamperometria.....	22
3. Filmes de polidopamina crescidos em carbono	27
3.1. Caracterização de filmes de polidopamina formados espontaneamente	27
3.1.1. Propriedades Óticas, Morfológicas e Hidrofilicidade	27
3.1.2. Propriedades eletroquímicas	32
3.2. Crescimento Potenciodinâmico de Polidopamina	36
4. Biossensores de carbono baseados em PDA e Lacase	45
4.1. Atividade Catalítica da Lacase	45
4.2. Caracterização dos eletrodos de Grafite/PDA/Lac.....	46
4.3. Grafite/PDA/Lac versus Grafite/ePDA/Lac	50
5. Biossensores de carbono baseados em PDA, Lacase e Nanopartículas	57
5.1. Caracterização de nanopartículas PDA@NPs por Espectroscopia UV-Visível.....	57
5.2. Comportamento eletroquímico de filmes modificados com PDA@NPs	58
5.3. Caracterização dos eletrodos de Grafite/PDA/Lac+NPs.....	60

5.4.	Comportamento catalítico de filmes de polidopamina modificados com conjugados Lac&PDA@NPs	62
5.5.	Caracterização dos sensores Grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs	64
5.6.	Comparação entre as Plataformas de Grafite Modificadas	68
6.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	73
7.	Referências bibliográficas.....	77

Índice de tabelas

Tabela 2.1: Composição das soluções tampão utilizadas e respetiva acidez medida após ajuste com 1M de NaOH; *Preparado a partir de uma saqueta comercial da Merck.	11
Tabela 3.1: Ângulos elipsométricos médios (Ψ e Δ) e parâmetros óticos calculados (n_s e k_s) do carbono vítreo com os respectivos desvios padrões ($n = 19$).	28
Tabela 3.2: Ângulos elipsométricos médios (Ψ e Δ) e respetivos desvios padrões ($n = 3$) das superfícies GC/PDA modificadas com diferentes tempos de polimerização (1, 8 e 14 h) e ângulos de incidência (60° , 65° e 70°).	29
Tabela 3.3: Índices de refração e espessuras médias ($n = 3$) dos filmes de polidopamina crescidos durante 1, 8 e 14 horas, e respetivos erros de ajuste multiangular médio (MAE). Coeficiente de extinção (k_{PDA}) foi fixado a 0,4.	30
Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados às respostas amperométricas do eletrodo modificado grafite/PDA/Lac no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.	50
Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/ePDA/Lac à adição de ABTS, no primeiro e segundo dias de utilização.	53
Tabela 4.3: Parâmetros analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/ePDA/Lac a baixas e altas concentrações de ABTS, no primeiro e segundo dias de utilização.	54
Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs à adição de ABTS, no primeiro e segundo dia de utilização.	62
Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA+Lac&PDA@NPs à adição de ABTS.	64
Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs à adição de ABTS no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.	66
Tabela 5.4: Parâmetros analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs a baixas e altas concentrações de ABTS, no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.	67

Índice de figuras

Figura 1.1: Exemplos de polifenóis e poluentes fenólicos de interesse tecnológico e ambiental (os grupos mono-, di- e trifenol encontram-se destacados a azul).	1
Figura 1.2: Constituintes base de um biossensor enzimático para a deteção de compostos fenólicos - adaptado de [20].	2
Figura 1.3: Esquema reacional simplificado da oxidação catalítica de difenóis a radicais fenoxilo promovida pela lacase, com a simultânea redução do oxigénio molecular a água – adaptado de [22] e [25].	3
Figura 1.4: (a) Modelos sugeridos para a estrutura complexa da polidopamina (PDA) – adaptado de [41]; (b) Processo de deposição de filmes de polidopamina (PDA) – adaptado de [44].	5
Figura 1.5: Reatividade latente dos grupos quinona presentes na polidopamina – adaptado de [48] e [50].	5
Figura 1.6: (a) Estrutura cúbica em espinela inversa (Fd3m) da magnetite constituída por lugares tetraédricos (Fe^{2+} a verde), por lugares octaédricos (Fe^{2+}/Fe^{3+} a castanho) e pela malha compacta de aniões (O^{2-} a cinzento) – retirado de [62]; (b) Morfologias típicas de nanocompósitos de	

nanopartículas magnéticas (esferas azuis) e materiais não-magnéticos (cinzento) – adaptado de [61].	7
Figura 1.7: Mecanismos que incrementam a atividade enzimática por nanopartículas – adaptado de [63].	8
Figura 2.1: Materiais de carbono utilizados: carbono vítreo (a), HOPG (b) e grafite policristalina (c).	12
Figura 2.2: Células eletroquímicas de acrílico (a) e de vidro (b).	12
Figura 2.3: Difractograma de raios-X de pós (a) e imagem TEM (b) das nanopartículas de magnetite com dimensão média 40 nm (c) – adaptado de [64].	14
Figura 2.4: Esquema da preparação do eléctrodo modificado carbono/PDA/Lac+NPs segundo o método A.	14
Figura 2.5: Esquema da preparação do eléctrodo modificado carbono/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs segundo o método B.	15
Figura 2.6: Reflexão numa superfície plana das componentes paralela (E_{ip}) e perpendicular (E_{is}) ao plano de incidência (POI), da luz polarizada – adaptado de [70].	16
Figura 2.7: Eventos de reflexão (r_{mn}) e transmissão (t_{mn}) da luz polarizada no modelo de 3 fases isotrópicas: substrato semi-infinito (n_2, k_2), filme fino (n_1, k_1, L_1) e ambiente (n_0) – adaptado de [72].	17
Figura 2.8: Capturas de ecrã do software desenvolvido para os ajustes elipsométricos: janela principal (a), opções de importação e exportação (b) e janela informativa do mínimo global encontrado (c).	19
Figura 2.9: Ângulos de contacto formados por uma gota séssil numa superfície lisa e homogénea – adaptado de [75].	20
Figura 2.10: Esquema do mecanismo retroativo de obtenção de imagem na microscopia de força atómica (AFM) – retirado de [79].	21
Figura 2.11: Ciclo de varrimento linear do potencial aplicado com inversão de sentido no tempo λ (a) e voltamograma típico de uma transferência eletrónica reversível – adaptado de [82].	22
Figura 2.12: Pulso simples de potencial (a) e corrente de resposta típica (b) num ensaio cronoamperométrico – adaptado de [82].	24
Figura 3.1: Carta de controlo dos ângulos elipsométricos (Ψ e Δ) da superfície do carbono vítreo medidos a 70°; linha tracejada representa o valor médio e linhas a cheio os limites de controlo ($\pm 3\sigma$).	28
Figura 3.2: Ângulos de contacto e respetivos registos fotográficos de gotas de água séssis (1 μ L) em superfícies de carbono vítreo polido e modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas. O desvio de padrão diz respeito à média do ângulo esquerdo e direito de 10 gotas idênticas ($n = 20$).	30
Figura 3.3: Imagens topográficas obtidas por AFM (1x1 μ m ²) e respetivas rugosidades (R_q) da superfície de carbono vítreo polido e modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas.	31
Figura 3.4: Imagens topográficas obtidas por AFM e respetivos perfis de altura média, de riscos propositados em carbono vítreo modificado com filmes de polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas. Os perfis de altura média correspondem às áreas assinaladas a vermelho.	32
Figura 3.5: Voltamograma cíclico do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47$ cm ²) em solução de dopamina a 0,5 mM (a); Decaimentos da densidade de corrente do pico anódico (j_p^a) predominante do eléctrodo modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas, em ciclos voltamétricos sucessivos (b). Primeiro ciclo voltamétrico do mesmo eléctrodo limpo (linha tracejada) e modificado com filmes de polidopamina crescidos durante 1, 8 e 14 horas (linhas coloridas) (c); Primeiros cinco ciclos voltamétricos do eléctrodo modificado com um filme de	

polidopamina crescida durante 1 hora (d) – setas indicam o sentido da variação de corrente ao longo dos varrimentos; Todos os voltamogramas foram registados a 50 mV/s em tampão arejado citrato-fosfato com pH 4,6.	33
Figura 3.6: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina crescida durante 8 horas, registados a 50, 100, 200, 300 e 400 mV/s, em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6, após a estabilização eletroquímica ilustrada na figura 3.5b (a). Verificação da linearidade entre a densidade de corrente de pico média ($j_p = j_p^a/2 + j_p^c /2$) e a velocidade de varrimento (v) no intervalo de 5 a 400 mV/s dos eléctrodos modificados com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas (b).	34
Figura 3.7: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) antes e após modificado com polidopamina crescida durante 1 e 14 horas, registados a 25 mV/s em tampão fosfato-salino de pH 7,4 desoxigenado com N_2 contendo 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (a) e registados a 5 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 4,6 desoxigenado com N_2 contendo 1 mM ABTS (b). .	35
Figura 3.8: Crescimento potenciodinâmico de polidopamina sobre o eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) executado às velocidades de varrimento 20 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 mV/s (d), durante 3 ciclos, em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 e contendo 10 mM dopamina.	37
Figura 3.9: Etapas reacionais químicas e eletroquímicas da eletropolimerização da dopamina - adaptado de [51], [54], [116] e [121].	38
Figura 3.10: Primeiros voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada a 20 (a) e 200 mV/s (c), registados a 50 mV/s durante 5 ciclos em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 ; Respetivos decaimentos da densidade de corrente do pico anódico predominante (j_p^a) ao longo do varrimento de potencial - (b) e (d).	39
Figura 3.11: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada a 20 (a) e 200 mV/s (c), registados a 50, 100, 200, 300 e 400 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 ; Respetivas verificações da linearidade entre as densidades de corrente de pico (j_p) e a velocidade de varrimento (v) – (b) e (d).	40
Figura 3.12: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada com 3 ciclos de varrimento de potencial a 20, 50, 100 e 200 mV/s, registados a 25 mV/s em tampão fosfato-salino de pH 7,4 desoxigenado com N_2 e contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1 mM.	41
Figura 4.1: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) registados a 5 mV/s em solução de lacase diluída 1:100 em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo 0, 1, 7, 10, 15 e 30 μM ABTS (a); Esquema da oxidação enzimática do ABTS pela lacase na presença de oxigénio e regeneração eletroquímica do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo eléctrodo (b); Voltamograma cíclico do mesmo eléctrodo em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo 0,5 mM de ABTS registado a 5 mV/s (c); Curva Michaelis-Menten obtida a partir das correntes catalíticas ($j-j_b$) dos voltamogramas do gráfico (a), medidas a 0,4 V (d).	46
Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registado a 2 mV/s (a) e cronoamperogramas resultantes do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ (b), em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100 e 200 μM – as setas indicam o sentido da evolução da corrente com o aumento de concentração de substrato; Curvas Michaelis-Menten obtidas a partir das correntes catalíticas amperométricas ($j-j_b$) dos eléctrodos grafite/Lac e grafite/PDA/Lac (c).	47
Figura 4.3: Respostas cronoamperométricas do eléctrodo grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no segundo (a) e quinto (b) dia de utilização, obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$	

em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM	49
Figura 4.4: Curvas Michaelis-Menten do eletrodo modificado grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.....	50
Figura 4.5: Crescimento potenciodinâmico de polidopamina sobre grafite ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 e contendo dopamina a 10 mM (a); Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite e grafite/ePDA/Lac registrados a 50 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 4,6 desoxigenado com N_2 (b).	51
Figura 4.6: Resposta cronoamperométrica do eletrodo grafite/ePDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no primeiro dia de utilização obtida pela aplicação do pulso simples $E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 400 μM (a); Curvas de resposta ajustadas para as correntes catalíticas ($j-j_b$) referentes ao primeiro e segundo dia de utilização do mesmo eletrodo modificado (b); Eficiências catalíticas (j_{max}/K_M) dos eletrodos modificados com lacase imobilizada em polidopamina espontânea e eletrossintetizada, no primeiro e segundo dias de utilização (c).	52
Figura 5.1: Espectros UV-Vis ($\ell = 1 \text{ cm}$) de suspensões aquosas de nanopartículas de magnetite (NPs), de nanopartículas modificadas com polidopamina (PDA@NPs) e de solução aquosa de dopamina a 10 μM (a); Espectro UV-Vis ($\ell = 1 \text{ cm}$) inicial da solução de polimerização diluída em água ($[\text{DA}]_i = 0,5 \text{ mM}$) e espectro da mesma solução após 2 horas (b).	58
Figura 5.2: Primeiros voltamogramas cíclicos do eletrodo de grafite ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) modificado com um filme de polidopamina (PDA) e do eletrodo modificado com nanopartículas de magnetite incorporadas em polidopamina (PDA+PDA@NPs), registrados a 10 mV/s – setas indicam a evolução dos picos de corrente com o avanço dos ciclos de varrimento (a); Densidades de corrente dos eletrodos grafite, grafite/PDA e grafite/PDA+PDA@NPs após aplicação do pulso simples $E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ com adições sucessivas de ABTS a 25, 50, 100, 150 e 200 μM (b); Cronoamperograma do eletrodo grafite/PDA+PDA@NPs (c) nas mesmas condições do ensaio b. Em todos os casos o eletrólito consistiu numa solução arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.....	59
Figura 5.3: Voltamogramas cíclicos do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registrado a 2 mV/s (a) e cronoamperogramas resultantes do pulso simples $E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ (b), em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100 e 200 μM – as setas indicam o sentido da evolução da corrente com o aumento de concentração de substrato; Curvas Michaelis-Menten obtidas a partir das correntes catalíticas ($j-j_b$) amperométricas do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs do primeiro dia de utilização (c).....	61
Figura 5.4: Voltamogramas cíclicos do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registrados a 10 mV/s na ausência e presença de ABTS (200 μM) no segundo dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) no primeiro e segundo dia de utilização do eletrodo modificado, construídas a partir das correntes patamar cronoamperométricas ($E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$) na presença de ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (b). Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.	61
Figura 5.5: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de grafite/PDA, grafite/PDA+PDA@NPs e grafite/PDA+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registrados a 10 mV/s em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 (a) – setas indicam a evolução das densidades de corrente de pico com o avanço do varrimento de potencial; Curva Michaelis-Menten ajustada para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ ao eletrodo	

grafite/PDA+Lac&PDA@NPs na presença de ABTS nas concentrações 0,2; 0,6; 1,5; 3,2; 5,3; 11; 21; 32 e 43 μM (b).....	63
Figura 5.6: Voltamogramas cíclicos do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registados a 10 mV/s na ausência e presença de ABTS (200 μM) no primeiro dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) produzidas na primeira utilização dos eletrodos de grafite modificados com polidopamina, lacase e nanopartículas em diferentes arquiteturas (b); Cronoamperograma do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs obtido pela aplicação do pulso simples $E_{OC} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ na presença de ABTS nas concentrações 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (c); Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.65	
Figura 5.7: Voltamogramas cíclicos do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) na ausência e presença de ABTS (400 μM) no quinto dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) do mesmo eletrodo no primeiro, segundo e quinto dia de utilização (b); Cronoamperogramas obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{OC} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ na presença de ABTS nas concentrações 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (c); Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.	66
Figura 5.8: Imagens topográficas por AFM ($1,07 \times 1,07 \text{ }\mu\text{m}^2$) e respectivas rugosidades (R_q) da superfície de grafite antes e após crescimento de um filme PDA+Lac+Lac&PDA@NPs.	68
Figura 5.9: Gráfico comparativo dos valores de K_M e sensibilidades obtidas na primeira utilização das diferentes plataformas de grafite modificada com polidopamina, lacase e nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4). * K_M determinado por voltametria cíclica com eletrodo de GC e lacase em solução (figura 4.1d).	68

Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico).
AFM	Microscopia de Força Atômica (do Inglês, <i>Atomic Force Microscopy</i>).
CPB	Tampão citrato-fosfato (do Inglês, <i>citrate-phosphate buffer</i>).
CV	Voltametria cíclica (do Inglês, <i>Cyclic Voltammetry</i>).
DA	Dopamina.
DAC	Dopaminocromo.
DHI	Indole-5,6-diol (do Inglês, <i>5,6-dihydroxyindole</i>).
DOPA	3,4-Dihidroxifenilalanina (do Inglês, <i>3,4-dihydroxyphenylalanine</i>).
EC (número)	Comissão de Enzimas (do Inglês, <i>Enzyme Commission</i>) da IUBMB (<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>).
EDCs	Compostos disruptores endócrinos (do Inglês, <i>endocrine-disrupting compounds</i>).
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do Inglês, <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>).
ePDA	Polidopamina eletrossintetizada.
EQCM	Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (do Inglês, <i>Electrochemical Quartz Crystal Microbalance</i>).
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do Inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>).
GC	Carbono vítreo (do Inglês, <i>glassy carbon</i>).
HOPG	Grafite pirolítica altamente ordenada (do Inglês, <i>highly oriented pyrolytic graphite</i>).
HPCs	Compostos fenólicos halogenados (do Inglês, <i>halogenated phenolic compounds</i>).
HQ	Hidroquinona.
HRP	Peroxidase hémica do rábano-de-cavalo (do Inglês, <i>horseradish peroxidase</i>).
IQ	Indole-5,6-quinona.
ITO	Óxido de índio-estanho (do Inglês, <i>indium tin oxide</i>).
LDAC	Leucodopaminocromo.
MAE	Erro absoluto multiangular (do Inglês, <i>multiangular error</i>).
Mefp-5	Proteína 5 do pé de <i>Mytilus edulis</i> (do Inglês, <i>Mytilus edulis foot protein 5</i>).
NPs	Nanopartículas.
OCP	Potencial de circuito aberto (do Inglês, <i>open circuit potential</i>).
PBS	Tampão fosfato-salino (do Inglês, <i>phosphate buffered saline</i>).
PCBs	Bifenilos policlorados (do Inglês, <i>polychlorinated biphenyls</i>).
PDA	Polidopamina.
PGG	1,2,3,4,6-Penta-O-galoil-β-D-glucose.
POI	Plano de incidência (do Inglês, <i>plane of incidence</i>).
Q	Quinona.
SCE	Elétrodo saturado de calomelanos (do Inglês, <i>Saturated Calomel Electrode</i>).
SPM	Microscopia de varrimento de sonda (do Inglês, <i>Scanning Probe Microscopy</i>).
STM	Microscopia de efeito de túnel (do Inglês, <i>Scanning Tunneling Microscopy</i>).
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do Inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>).
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.
XRD	Difração de raios-X (do Inglês, <i>X-Ray Diffraction</i>).

Símbolos

A	Área do eletrodo (cm^2)
c	Velocidade da luz no vácuo
E	Potencial (V)
$E^{0'}$	Potencial formal
$E_{1/2}$	Potencial a meia onda
E_p^a	Potencial de pico anódico ou de oxidação
E_p^c	Potencial de pico catódico ou de redução
i	Corrente (A)
i_p^a	Corrente de pico anódico ou de oxidação
i_p^c	Corrente de pico catódico ou de redução
j	Densidade de corrente ($\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)
j_p^a	Densidade de corrente de pico anódico ou de oxidação
j_p^c	Densidade de corrente catódico ou de redução
j_b	Densidade de corrente inicial ($[\text{S}]=0$)
j_{max}	Densidade de corrente catalítica máxima
k	Coefficiente de extinção
K_M	Constante aparente de Michaelis-Menten (M)
n	Índice de refração ou Número de eletrões envolvidos num processo redox
R_q	Rugosidade quadrática média (nm)
α	Absortividade (m^{-1})
Γ	Recobrimento superficial ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)
Δ	Desvio de fase ($^\circ$)
ε	Permissividade elétrica
θ_c	Ângulo de contacto ($^\circ$)
λ	Comprimento de onda (m)
v	Velocidade de varrimento ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$)
ρ	Resistividade elétrica ($\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) ou Coeficiente complexo de reflexão
σ	Desvio padrão
φ_0	Ângulo de incidência ($^\circ$)
Ψ	Ângulo azimutal ($^\circ$)

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Detecção de compostos fenólicos por biossensores enzimáticos

Nas últimas décadas a monitorização de compostos fenólicos utilizando dispositivos portáteis, baratos e de resposta rápida, tem vindo a crescer como área de investigação científica ^{[1],[2]}. O interesse por detetar, quantificar ou eliminar compostos que possuem um ou mais grupos hidroxilo ligados a um anel benzénico, reside no seu envolvimento e importância em múltiplas atividades económicas, nomeadamente a atividade alimentar, agroflorestal, médico-farmacêutica e ambiental. Essencialmente distinguem-se dois grandes grupos de compostos fenólicos com relevância tecnológica ou ambiental: os polifenóis e os poluentes fenólicos (figura 1.1).

Grande parte dos fenóis alvo têm uma origem natural como metabolitos secundários de plantas ^{[2],[3]}, acabando incorporados em produtos alimentares à base de vegetais e em resíduos agroflorestais. Neste contexto, os compostos naturais são denominados polifenóis e apresentam uma grande diversidade de estruturas – com massas moleculares baixas (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos), intermédias (flavonoides) e altas (taninos) ^[4] – assim como diversas atividades biológicas. Do ponto de vista da indústria alimentar, os polifenóis são relevantes por determinarem as propriedades organolépticas (cor, sabor, textura) e estabilidade oxidativa de alguns alimentos como vinhos ^[5], azeites ^[6], cervejas e cacau ^[3]. Para além disso, a sua presença em resíduos agroflorestais permite valorizar grandes quantidades de biomassa para fins farmacêuticos ^[7], melhoramento de alimentos ^[8], entre outros propósitos ^[9], uma vez que são atribuídas propriedades antioxidantes ^[10], anti-inflamatórias ^[11], antivirais ^[12] e anticancerígenas ^[13] aos polifenóis.

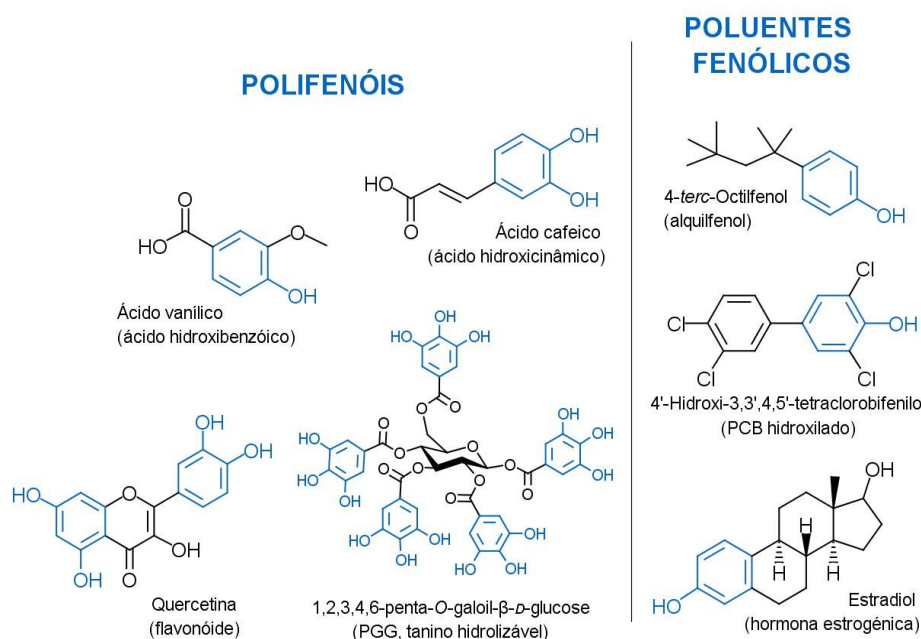


Figura 1.1: Exemplos de polifenóis e poluentes fenólicos de interesse tecnológico e ambiental (os grupos mono-, di- e trifenol encontram-se destacados a azul).

Numa perspectiva de preocupação ambiental, surgem os poluentes fenólicos provenientes de indústrias químicas, tais como, farmacêuticas e produtoras de resinas, tintas, têxteis, petroquímicos e papel^[2]. A detecção no ambiente de alquilfenóis, compostos fenólicos halogenados (HPCs)^[14] e hormonas estrogénicas sintéticas, são apenas alguns exemplos de classes de substâncias que têm alarmado as agências de proteção ambiental europeias e norte-americanas pela sua ampla disseminação e potenciais efeitos adversos em seres humanos e animais selvagens. Estes compostos recebem a denominação “disruptores endócrinos” (EDCs) por mimetizarem o efeito das hormonas naturais, interferindo desse modo com o normal funcionamento do sistema hormonal^[15]. Vários EDCs emergentes são fármacos, resistentes à degradação biológica, que atravessam as estações de tratamento de águas residuais sem sofrerem uma eliminação completa.

Atualmente a detecção de polifenóis e poluentes fenólicos é concretizada por técnicas espectrofotométricas e cromatográficas sofisticadas e fidedignas que permitem uma identificação quase inequívoca e uma quantificação a níveis vestigiais^[15]. No entanto, para além das técnicas analíticas clássicas são almejadas tecnologias que facilmente se adaptem à miniaturização, portabilidade e rapidez de análise no local de amostragem, mantendo a sensibilidade e seletividade dirigida ao analito alvo^[16]. Tirando partido da especificidade intrínseca de determinadas reações bioquímicas, os biossensores enquadram-se numa tecnologia flexível com potencial para executar análises seletivas, contínuas, em tempo real e diretas, recorrendo a uma preparação de amostra pouco extensa ou inexistente^[17]. Tal como ilustrado na figura 1.2, um biossensor é constituído por três partes principais que permitem converter um evento bioquímico (reação ou ligação) num sinal físico mensurável (óptico, elétrico ou magnético): o bioreceptor, o transdutor e o detetor^{[18],[19]}. O bioreceptor é o componente biológico (enzima, anticorpo, DNA, célula, organelo ou bacteriófago) responsável por interagir especificamente com o analito, produzindo uma alteração físico-química na proximidade do transdutor onde se encontra imobilizado. Posteriormente o sinal é transmitido ao detetor que o amplifica e processa de modo a concretizar um resultado. Dependendo do tipo de bioreceptor ou transdução os biossensores podem ser denominados por imunossensores, genossensores, sensores enzimáticos ou catalíticos, etc, ou por sensores eletroquímicos, óticos, piezoelétricos, magnetoelásticos, térmicos ou calorimétricos. De um modo geral, os biossensores enzimáticos com transdução eletroquímica destacam-se por dominarem o mercado dos biossensores^[16] não só pelo ímpeto no seu crescimento após a comercialização do primeiro sensor de glucose em 1972^[19], mas também pela simplicidade, rapidez e baixo custo de análise que o uso de biomoléculas proporciona relativamente ao uso de células ou organelos^[18].

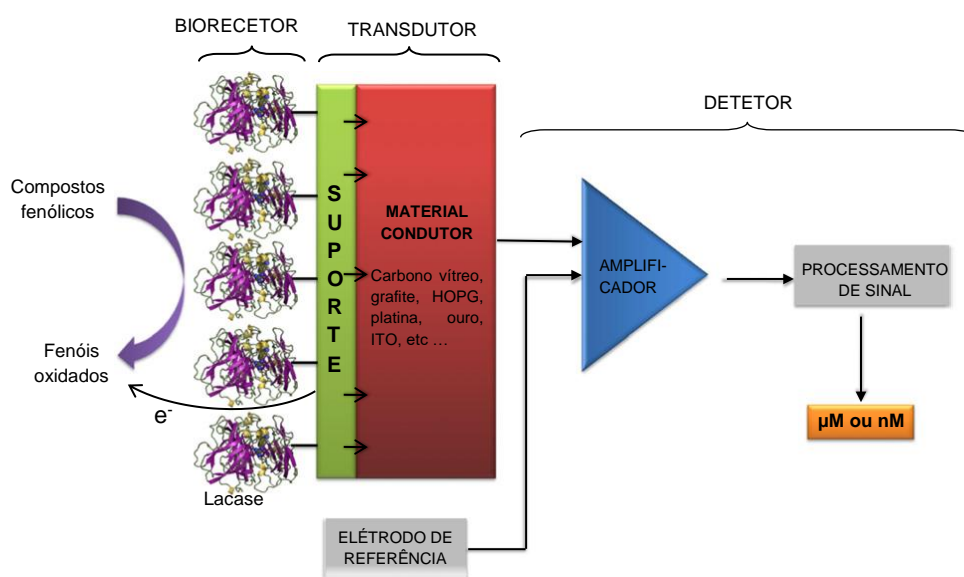


Figura 1.2: Constituintes base de um biossensor enzimático para a detecção de compostos fenólicos - adaptado de [20].

Enzimas com atividade catalítica para a oxidação de fenóis como a tirosinase, a peroxidase hémica HRP (*horseradish peroxidase*) e a lacase, têm sido investigadas em termos dos seus desempenhos na detecção de compostos fenólicos^[2]. A tirosinase demonstrou ser pouco estável e muito sensível a inibidores enquanto que a peroxidase depende da presença de peróxido de hidrogénio de modo a completar a sua função catalítica^[21]. A lacase, por outro lado, apresenta uma atividade catalítica estável após imobilização, com uma ampla gama de substratos oxidáveis. Trata-se de uma oxidoreductase (EC 1.10.3.2) extraída principalmente de fungos e presente em algumas bactérias, plantas e insetos^[22], que catalisa a oxidação de monofenóis, *orto*- e *para*-difenois, polifenóis, ligninas, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas, com a simultânea redução de oxigénio molecular a água. Apesar do mecanismo reacional detalhado não ser ainda completamente conhecido, várias propostas foram publicadas indo ao encontro dos dados cinéticos atuais^{[23],[24]}. Na figura 1.3 apresenta-se um esquema reacional simplificado do ciclo catalítico da lacase onde intervêm dois centros ativos de cobre. No centro catalítico do cobre T1, o substrato fenólico é oxidado no respetivo grupo hidroxilo, doando um eletrão e um protão e convertendo-se num radical fenoxilo. Tratando-se originalmente de um difenol, este substrato pode voltar a ser oxidado no segundo grupo hidroxilo disponível ou pode sofrer dismutação acabando, de um modo ou outro, por originar um produto na forma de quinona^{[25],[26],[27]}. Durante o ciclo catalítico da lacase são transferidos intramolecularmente 4 eletrões do centro T1 para o centro trinuclear T2/T3 que se encontram separados pelo tripéptido histidina-cisteína-histidina (His-Cis-His) a uma distância de 13-14 Å, permitindo a redução completa do oxigénio molecular a água. Para além dos substratos fenólicos, a transferência eletrónica para o cobre T1 pode partir de substratos não-fenólicos como o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonónico) (ABTS), uma amina aromática amplamente utilizada como substrato modelo na avaliação da atividade catalítica de lacases^[28], por técnicas espectrofotométricas^[22] e eletroquímicas^[29], tendo sido igualmente empregue neste trabalho.

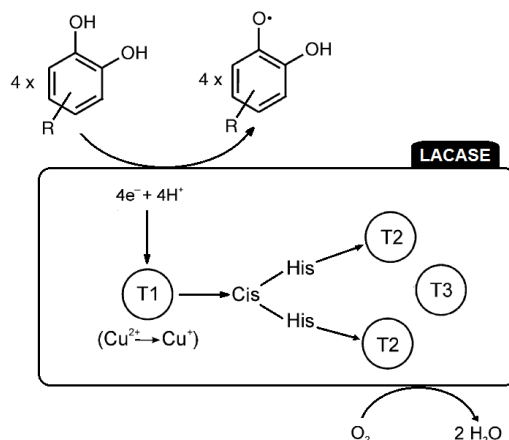


Figura 1.3: Esquema reacional simplificado da oxidação catalítica de difenóis a radicais fenoxilo promovida pela lacase, com a simultânea redução do oxigénio molecular a água – adaptado de [22] e [25].

A versatilidade em oxidar diversos substratos confere à lacase um grande potencial tecnológico nas áreas da biorremediação, biocatálise, conversão de energia e biossensores. Como aplicações promissoras destacam-se, a desintoxicação de borras de café e resíduos da moagem de azeitona, degradação de tintas, xenobióticos e pesticidas, biodegradação de material lignocelulósico, síntese orgânica através de biocatálise sustentável e redução do oxigénio molecular em células de biocombustível para fins de produção de energia^{[22],[20],[30]}. Apesar dos enzimas terem um papel bem estabelecido em diversas indústrias^[31], a estabilidade operacional continua a ser um dos fatores mais impeditivo para concretizar a comercialização das tecnologias baseadas nestes biocatalisadores^[32]. Auspiciosamente, a imobilização de enzimas permite a sua estabilização, reutilização ou até mesmo

melhoramento da sua atividade e seletividade^{[33],[34]}. Pelos motivos apontados, diversos trabalhos científicos concretizaram a imobilização da lacase em diversos suportes insolúveis recorrendo a metodologias de natureza física e química^[20]. O aprisionamento e encapsulamento em matrizes poliméricas são duas das metodologias mais simples que não produzem alterações estruturais na biomolécula, no entanto, estas imobilizações físicas são caracterizadas por pequenas quantidades retidas e por limitações na transferência de massa. Imobilizações químicas baseada na adsorção eletrostática possibilitam, em alguns casos, a melhoria da atividade da lacase, mas as interações estabelecidas são sensíveis a variações de pH e à força iônica do meio. Apontada como a metodologia de imobilização mais utilizada é a imobilização covalente por resultar em estabilidades promissoras do ponto de vista industrial. Neste caso a superfície do suporte insolúvel deve ser modificada com grupos de reatividade apropriada aos resíduos de aminoácidos que idealmente não estão envolvidos na função catalítica. Ótima estabilidade do enzima pode ser atingida se múltiplos pontos da biomolécula forem ligados ao suporte^[34], existindo, no entanto, a possibilidade de interferir com a estrutura tridimensional da mesma. Qualquer um dos tipos de imobilização anteriormente referidos apresentam vantagens e desvantagens que refletem a dificuldade do desafio interdisciplinar que é a imobilização de enzimas.

1.2. Polidopamina como plataforma funcional bio-inspirada

Entre a primeira publicação em 2007 na revista *Science*^[35] e a presente data, o número de aplicações baseadas em polidopamina (PDA) tem vindo a aumentar, demonstrando o interesse generalizado por este novo material^{[36],[37]}. Na sua conceção, a polidopamina foi inspirada nas propriedades adesivas dos mexilhões marinhos (*Mytilus edulis*) capazes de se fixarem em diversas superfícies húmidas^[38]. Na composição da proteína segregada pelo pé do mexilhão (Mefp-5) foram identificados os resíduos de aminoácidos maioritários (DOPA e lisina) a partir dos quais se pôde atribuir as propriedades adesivas à presença de grupos difenol e aminas primárias^[39]. Como passo lógico, uma catecolamina simples foi selecionada, a dopamina (figura 1.4a), para criar um material que mimetizasse as propriedades adesivas das placas terminais dos filamentos dos mexilhões. Em meio alcalino e na presença de um oxidante como o oxigénio molecular, a dopamina sofre uma polimerização oxidativa espontânea, cobrindo virtualmente qualquer tipo de superfície desde metais, óxidos e semicondutores, até cerâmicas e polímeros plásticos^[35], com um filme fino de propriedades óticas e eletrônicas semelhantes à eumelanina^[40], que se denominou polidopamina. Do ponto de vista mecanístico a polimerização da dopamina é baseada na ramificação de três tipos de monómeros: dopamina na forma não ciclizada e os dois derivados cíclicos na forma de indolina e índole. Dependendo da concentração de monómero, oxidante e presença de iões metálicos, a polidopamina poderá apresentar diferentes composições de oligómeros com diferentes ramificações^{[41],[42]}, resultando num material heterogéneo de estrutura complexa. Na figura 1.4a são apresentados os vários modelos estruturais da polidopamina que derivam do paralelismo reacional entre a ciclização e a ramificação dos monómeros e oligómeros. Nos extremos encontram-se os modelos da policatecolamina e do poli-(indole-5,6-diol) que sendo baseados apenas em interações covalentes entre os monómeros demonstraram não ser muito realistas^[41]. As interações por transferência de carga, empilhamento π - π e pontes de hidrogénio, comprovaram ser muito relevantes não só no processo de montagem de oligómeros^[43] como também na agregação supramolecular e formação do filme^{[40],[44]} (figura 1.4b). Novamente a concentração de dopamina e a concentração de oxigénio dissolvido são fatores determinantes na velocidade de agregação de partículas e deposição do filme^[45], tendo-se reportado uma concentração mínima de 10 mM para garantir o revestimento de superfícies^[36]. Simultaneamente, concentrações mais elevadas de dopamina na solução de polimerização favorecem a sua incorporação na polidopamina, resultando numa maior quantidade de aminas primárias disponíveis para interagir com a superfície^[42].

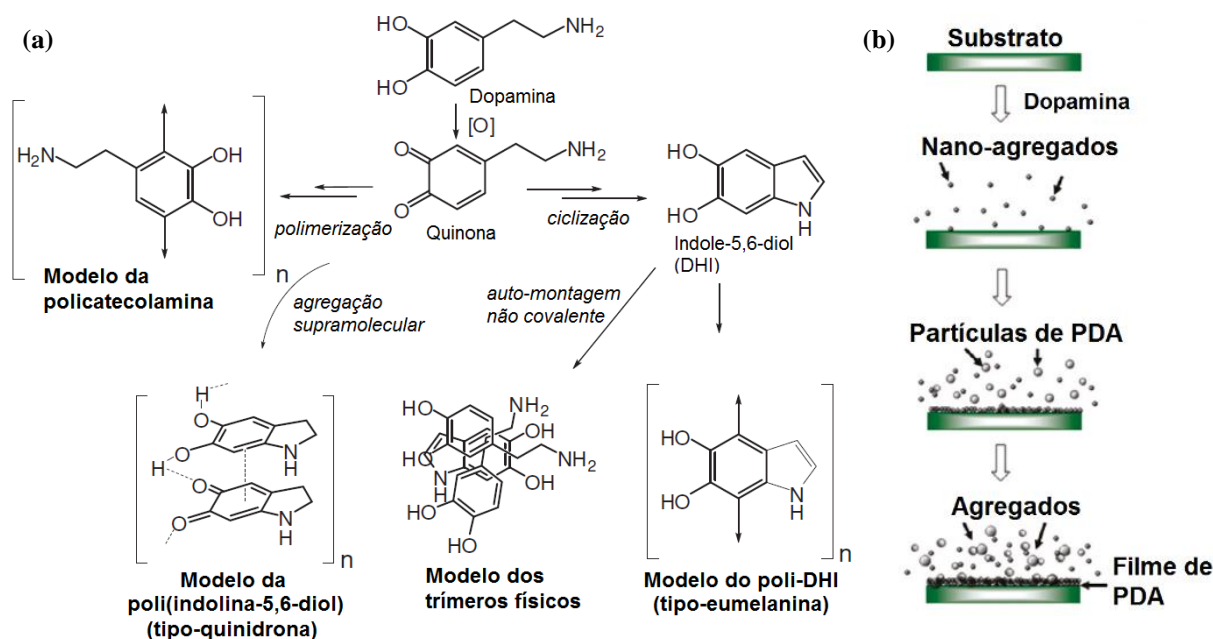


Figura 1.4: **(a)** Modelos sugeridos para a estrutura complexa da polidopamina (PDA) – adaptado de [41]; **(b)** Processo de deposição de filmes de polidopamina (PDA) – adaptado de [44].

Para além das propriedades adesivas da polidopamina, a sua biocompatibilidade^[37] e simplicidade de preparação sem a necessidade de instrumentação especializada ou condições drásticas, tornam este material muito interessante do ponto de vista tecnológico. Os atuais métodos para modificar superfícies, como a deposição camada-por-camada, tratamento por plasma e automontagem de monocamadas, são geralmente complexos, morosos e aplicáveis a poucos tipos de superfícies^[36]. Uma característica que torna a polidopamina conveniente à modificação de superfícies, prende-se com o facto de conter grupos quinona com reatividade latente conhecida, permitindo assim ligar compostos orgânicos, biomoléculas ou polímeros que apresentem grupos amina, tiol ou imidazole, através do ataque nucleofílico ao carbonilo ou ao anel benzénico^{[46],[47]} (figura 1.5). No que diz respeito à imobilização covalente de biomoléculas, poucos são os estudos que comprovem a natureza covalente da ligação entre proteínas e polidopamina^{[47],[48]}, faltando ainda completar algum do conhecimento fundamental exigido por esta tarefa multidisciplinar^[49]. Não obstante, a polidopamina tem sido progressivamente explorada e facilmente integrada no *design* de biossensores, particularmente na sua conjugação com nanomateriais dos mais diversos tipos^[36].

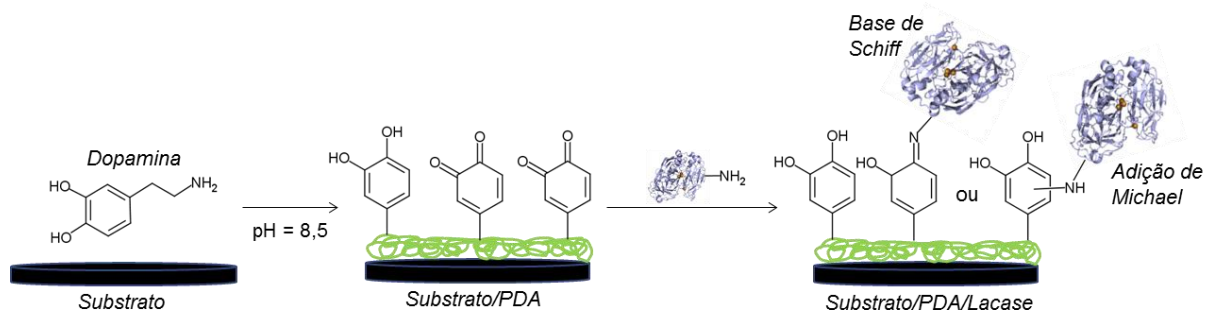


Figura 1.5: Reatividade latente dos grupos quinona presentes na polidopamina – adaptado de [48] e [50].

Pela aplicação de um potencial suficientemente anódico a um eletrodo submerso numa solução de dopamina, é igualmente possível formar filmes finos de polidopamina por um processo de eletropolimerização^{[51],[52],[53]}. Apesar deste modo de síntese ter sido ainda pouco explorado^{[54],[55]}, apresenta vantagens face às polimerizações químicas como é o exemplo do controlo das propriedades (espessura, condutividade, eletroatividade, porosidade, estado de oxidação)^[56], rapidez de síntese, utilização de menor quantidade de monómero e possibilidade de polimerização em meio neutro. Até ao momento nenhum estudo fundamental acerca da imobilização de enzimas em PDA eletrossintetizada foi publicado, deixando em aberto a potencialidade deste novo material na área dos biossensores enzimáticos.

1.3. Propriedades e aplicações das nanopartículas de magnetite

Verificou-se na última década um grande desenvolvimento na síntese de nanopartículas (NPs) magnéticas de óxidos de ferro, impulsionado pelas suas promissoras aplicações tecnológicas que incluem o transporte direcionado de fármacos, a imagiologia de ressonância magnética, o tratamento por hipertermia e termoablação magnética, a separação e os biossensores^[57]. A adequação deste nanomaterial a aplicações médicas deve-se essencialmente à biocompatibilidade que apresenta, assim como ao facto de ser ambientalmente seguro e com sínteses de baixo custo económico. De entre os vários óxidos de ferro, a magnetite (Fe_3O_4) ressalta por conter na sua estrutura cristalina de espinela inversa ambas as formas divalente e trivalente do ferro (figura 1.6a), o que lhe confere propriedades eletrónicas e magnéticas únicas^[58]. Em virtude da sobreposição das orbitais d de iões adjacentes Fe^{2+} e Fe^{3+} , os eletrões podem ser conduzidos ao longo dos lugares octaédricos por um mecanismo de *hopping*, o que justifica o menor *bandgap* e resistividade da magnetite comparativamente com os restantes óxidos de ferro semicondutores. No que toca à magnetização de saturação dos óxidos de ferro macrocristalinos, destaca-se novamente a magnetite pela superior magnetização resultante das interações de *spin* antiparalelas entre os iões das posições tetraédricas (Fe^{3+}) e as posições octaédricas ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)^[59]. Importa referir que as propriedades magnéticas dos materiais nanoestruturados dependem fortemente do método de síntese utilizado, a partir do qual se pode ajustar a dimensão e forma das nanopartículas.

Com o advento de novos métodos sintéticos surgem simultaneamente desafios inerentes ao tamanho nanométrico dos materiais, nomeadamente, o impedimento da agregação de partículas e a estabilização química a longo prazo. A magnetite em particular é suscetível à oxidação em ambientes oxigenados convertendo-se em *maghemite* ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o que compromete as suas propriedades catalíticas e magnéticas a longo prazo^{[58],[60]}. Por esse motivo inúmeros trabalhos reportam a conjugação de nanopartículas com outros materiais de modo a estabilizar as dispersões coloidais, prevenir oxidação deteriorante e ainda obter novas propriedades óticas, eletrónicas, catalíticas e magnéticas^[61]. Uma possível classificação generalizada dos nanocompósitos é apresentada na figura 1.6b, a qual abarca as arquiteturas *core-shell* (nanoestruturas concêntricas com uma ou múltiplas camadas), as morfologias do tipo *Janus* (nanoestruturas assimétricas com fases distintas), o encapsulamento/ancoramento em esferas poliméricas micrométricas, incorporação em matrizes poliméricas e a organização em cristal coloidal (agrupamento cristalino tridimensional de nanopartículas).

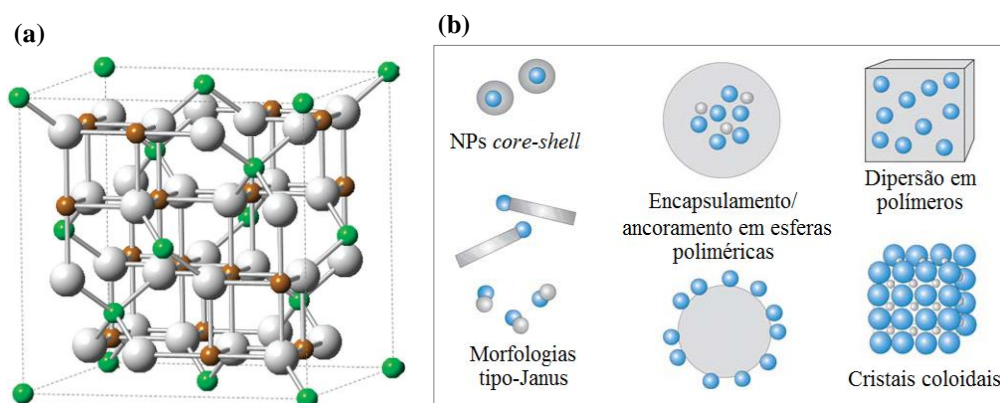


Figura 1.6: (a) Estrutura cúbica em espinela inversa (Fd3m) da magnetite constituída por lugares tetraédricos (Fe²⁺ a verde), por lugares octaédricos (Fe²⁺/Fe³⁺ a castanho) e pela malha compacta de aniões (O²⁻ a cinzento) – retirado de [62]; (b) Morfologias típicas de nanocompósitos de nanopartículas magnéticas (esferas azuis) e materiais não-magnéticos (cinzento) – adaptado de [61].

Muito para além das aplicações médicas focadas nas propriedades magnéticas da magnetite nanoparticulada, acomodam-se ainda outras aplicações que tiram partido dos efeitos de confinamento quântico, elevada área superficial e propriedades catalíticas intrínsecas a um material inorgânico: na indústria dos semicondutores e optoelectrónica, armazenamento de informação, catálise orgânica, fotocatalise, baterias e biossensores^[61]. Particularizando para o âmbito específico deste trabalho, as nanopartículas provocam efeitos extremamente convenientes do ponto de vista do *design* de um biossensor quando conjugadas com enzimas: mitigam problemas de imobilização (distorção na configuração nativa do enzima, impedimentos estereoquímicos e menores velocidades de difusão), aceleram a atividade enzimática e intensificam a sensibilidade de eléctrodos^[63]. Esta clara rutura do comportamento típico de enzimas imobilizadas em interfaces macroscópicas tem sido atribuída aos cinco mecanismos representados na figura 1.7: concentração enzimática localizada – permite criar pontos de alta concentração enzimática onde o substrato é consumido mais rapidamente do que numa solução de enzima; transporte de massa – o movimento browniano das NPs conjugado com a sua grande área superficial permite concentrar a sua periferia em substrato graças a interações eletrostáticas NPs-substrato; morfologia dos nanomateriais – dependendo da forma da nanopartícula as interações proteína-proteína indesejadas podem ser evitadas; interações favoráveis – dependendo da química superficial da nanopartícula interações favoráveis à manutenção ou incremento da atividade; orientação estratégica – pelo ajuste da química superficial o local com afinidade para o substrato pode ser direccionado para o seio da solução. Contudo o incremento da atividade enzimática foi apenas observado em alguns casos específicos não sendo fácil prever quando é que uma determinada conjugação enzima-NPs resultará em melhoramentos catalíticos. De forma semelhante, efeitos eletrocatalíticos sinérgicos observados em nanoconjugados de magnetite e metaloporfirinas não são explicáveis apenas por alterações a área superficial real de eléctrodos^[64]. Assim sendo, a atual visão incompleta deste tipo de sistemas continua a impulsionar novas combinações e arquiteturas de conjugação que poderão, futuramente, resultar em progressos significativos na área dos biossensores.

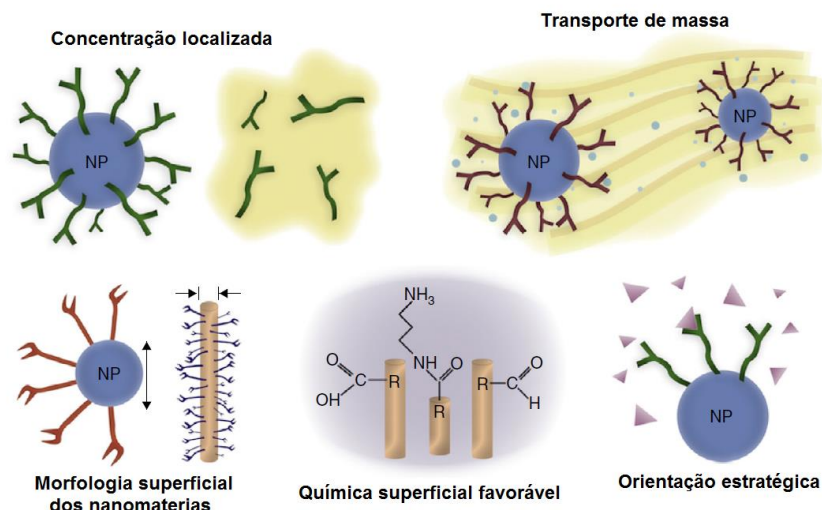


Figura 1.7: Mecanismos que incrementam a atividade enzimática por nanopartículas – adaptado de [63].

1.4. Objetivos e organização da dissertação

Considerando a necessidade tecnológica de criar um biossensor conceitualmente apto à portabilidade, miniaturização e rapidez de análise, sendo simultaneamente seletivo e sensível a composto fenólicos, considerando ainda a reatividade superficial da polidopamina e a potencialidade de melhoramento catalítico induzido por nanopartículas semicondutoras de magnetite, foi estabelecido como objetivo principal deste trabalho a *otimização da atividade catalítica de lacase covalentemente imobilizada em eletrodos de carbono de baixo custo modificados com polidopamina e nanopartículas semicondutoras de magnetite*. Foram ainda estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Sintetizar química e eletroquimicamente filmes finos de polidopamina, averiguando as suas propriedades eletroquímicas, óticas, morfológicas e hidrofiliçidade;
- 2) Imobilizar covalentemente lacase sobre filmes de polidopamina e determinar o desempenho catalítico e sensibilidade resultantes dirigidas a um substrato modelo;
- 3) Co-imobilizar lacase e nanopartículas de magnetite sobre filmes de polidopamina, explorando diferentes metodologias de modificação e avaliando o efeito catalítico resultante da conjugação.

Nos capítulos seguintes serão abordados os detalhes experimentais e base teórica das técnicas utilizadas (capítulo 2), a discussão dos resultados relativos à concretização dos objetivos 1, 2 e 3 (capítulos 3, 4 e 5, respetivamente) e por fim serão enumeradas as conclusões e traçadas perspectivas futuras (capítulo 6).

Capítulo 2

Detalhes experimentais

2. Detalhes experimentais

2.1. Reagentes

As substâncias sólidas utilizadas foram dopamina (DA; $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$; 189,64 g/mol; Sigma-Aldrich), tris(hidroximetil)aminometano ($NH_2C(CH_2OH)_3$; 121,14 g/mol), hexacianoferrato de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$; 329,26 g/mol; Merck), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) de diamônio (ABTS; $C_{18}H_{16}N_4O_6S_4 \cdot (NH_4)_2$; 548,7 g/mol; Sigma Chemical), ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; 210,1 g/mol; Sigma-Aldrich), hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4 ; 141,96 g/mol; Merck) e hidróxido de sódio ($NaOH$; 40,00 g/mol; Fluka). Como reagentes líquidos utilizaram-se etanol absoluto (C_2H_5OH ; 46,07 g/mol; Fisher Chemical), ácido clorídrico (HCl ~37%; $d=1,18$; Fischer Chemical) e água ultra pura ($\rho=18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) obtida a partir de um sistema Mili-Q da Milipore. Todos os reagentes referidos anteriormente foram utilizados diretamente, sem qualquer purificação. Para além destes foram preparadas as soluções tampão descritas na tabela seguinte:

Tabela 2.1: Composição das soluções tampão utilizadas e respetiva acidez medida após ajuste com 1M de $NaOH$; *Preparado a partir de uma saqueta comercial da Merck.

Designação	Composição	pH
Tris-HCl	50 mM Tris; 17 mM HCl	8,5
Citrato-fosfato (CPB)	27 mM Ácido cítrico; 47 mM Na_2HPO_4	4,6
Citrato-fosfato (CPB)	7 mM Ácido cítrico; 87 mM Na_2HPO_4	7,0
Fosfato-salino (PBS)*	8,0 mM Na_2PO_4 ; 1,14 mM KH_2PO_4 ; 138 mM $NaCl$; 2,7 mM KCl	7,4

Relativamente ao preparado de lacase (NovoZyme NS51003) abordada ao longo deste trabalho, trata-se de uma mistura comercial, gentilmente cedida por Alexandra Morana do *Istituto di Biologia Agroambientale e Forestale* (IBAF), situado em Nápoles, Itália. Testou-se a acidez do preparado ($pH = 8,0$) e avaliou-se a atividade catalítica de diluições do mesmo ($1:2 \times 10^5$) por espectrofotometria UV-Vis, acompanhando a formação linear do radical $ABTS^{+ \cdot}$ ($\epsilon_{420nm} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[65] em condições de saturação do substrato (2 mM), a $pH = 5$ (CPB) e à temperatura ambiente ($22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). O ensaio realizado em triplicado permitiu determinar a atividade do preparado em 370,6 U/mL. Utilizou-se o preparado diretamente ou diluído em tampão CPB, sem levar a cabo nenhum procedimento de purificação.

2.2. Materiais de eletrodo e células eletroquímicas

A possibilidade de utilizar materiais de eletrodo de baixo custo, boa condutividade e reatividade eletroquímica relativamente baixa^[66], impulsionou o uso de eletrodos de carbono neste trabalho indo ao encontro das necessidades atuais na área dos biossensores. No entanto, os materiais de carbono distinguem-se pela sua química e morfologia superficiais tornando-os mais ou menos adequados à recolha de informação em determinadas técnicas de caracterização. Dos três tipos de carbono utilizados (figura 2.1), o disco de carbono vítreo (GC) – com 1,11 cm de diâmetro e 0,21 cm de espessura – destaca-se pela sua isotropia e larga janela de potenciais de trabalho, tendo sido selecionado para estudar os filmes de polidopamina por várias técnicas, incluindo elipsometria. Como apoio a este estudo, utilizou-se a grafite pirolítica altamente ordenada

(HOPG) – com dimensões 1 cm×1 cm – na caracterização por microscopia de força atômica, devido à sua superfície atómicamente lisa. Por último, a grafite policristalina – com dimensões 2,3 cm×1,29 cm×0,07 cm – destaca-se pelo seu baixo custo e por esse motivo foi selecionada para investigar a viabilidade e as propriedades catalíticas dos filmes de polidopamina modificados com lacase e nanopartículas de magnetite.

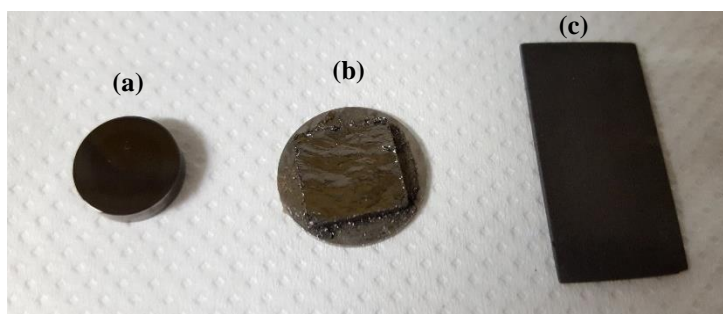


Figura 2.1: Materiais de carbono utilizados: carbono vítreo (a), HOPG (b) e grafite policristalina (c).

Nos ensaios eletroquímicos em particular recorreu-se à usual configuração de 3 eléctrodos onde a geometria em disco ou placa do eléctrodo de trabalho definiu a escolha da célula. No caso da célula de acrílico (figura 2.2a) o eléctrodo de trabalho em forma de disco encontra-se por baixo da solução, estando em contacto com o potencióstato por intermédio de uma fita de alumínio. Apoiados pela tampa da célula estão o contra-eléctrodo de folha de platina, o eléctrodo saturado de calomelano (SCE), assim como uma pipeta de Pasteur que permite a circulação de azoto. Neste tipo de célula, a área exposta do eléctrodo de trabalho é definida por um *O-ring* (0,47 cm²) que simultaneamente veda a saída de eletrólito. No caso da célula de vidro (figura 2.2b), todos os eléctrodos e pipeta são inseridos por cima da solução eletrolítica estando suportados por uma peça de poliuretano, o que permite usar agitação magnética. A delimitação da área exposta do eléctrodo de trabalho (2,9 cm²) foi conseguida envolvendo a restante superfície com fita de teflon após contacto eléctrico por uma garra dentada.

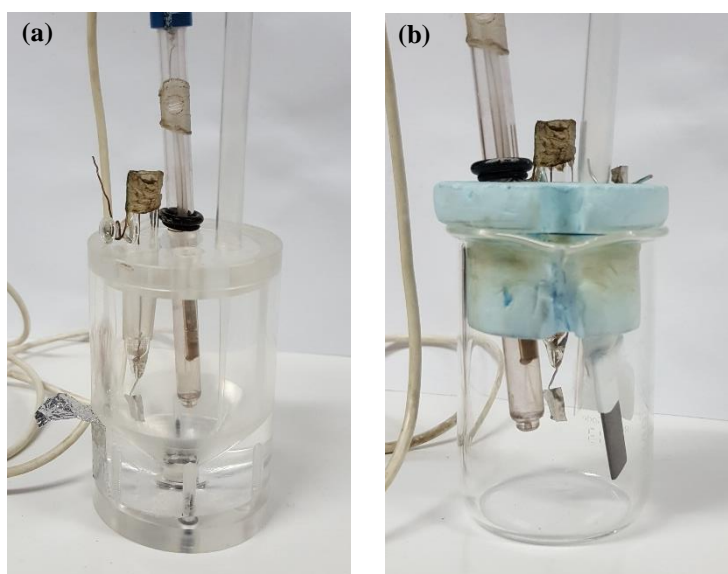


Figura 2.2: Células eletroquímicas de acrílico (a) e de vidro (b).

2.3.Procedimentos

2.3.1. Limpeza das superfícies grafíticas

De modo a garantir a reutilização e reprodutibilidade das superfícies, assim como prevenir a presença de contaminantes, foram implementados procedimentos de limpeza das superfícies de carbono enumerados a seguir. No que toca à limpeza do eletrodo de referência (SCE), procedeu-se a uma lavagem abundante com água seguida da absorção do excesso com papel absorvente. O contra-eletrodo de platina foi submetido à chama oxidante de butano/O₂ (Campingaz CV 369), lavado com água e seco parcialmente ao ar. Note-se que a limpeza do HOPG consistiu na escamação eficaz da superfície pela ação de fita-adesiva.

2.3.1.1. Polimento do carbono vítreo

Primeiramente a realizou-se a remoção de filmes anteriormente formados, polindo a superfície sobre um pano de fibra sintética (Buehler Microcloth) molhado com uma suspensão de alumina com 5 µm de granulometria (Buehler Alpha Micropolish). Após sonificação do eletrodo numa mistura de etanol-água (1:1) durante 10 minutos, repetiu-se o polimento utilizando as granulometrias 5; 1 e 0,3 µm sempre pela ordem indicada, e reduzindo o tempo de sonificação para 3 minutos apenas em água. Para garantir a completa remoção da alumina e detritos de polimento, foi realizado um passo de sonificação em água durante 15 minutos e uma secagem em corrente de azoto. Obtida uma superfície vítrea, brilhante e livre de manchas, recorreu-se por último a uma câmara de limpeza UV/ozono (ProCleaner™ Plus, Bioforce Nanosciences) durante 40 minutos, de modo a garantir a remoção de qualquer resto orgânico e obter uma superfície reprodutível^[67].

2.3.1.2. Polimento da grafite policristalina

A remoção de filmes anteriormente formados foi conseguida pela fricção das faces e arestas do eletrodo sobre uma lixa de água p1200 (SiC), seguida por uma sonificação em etanol-água (1:1) durante 10 minutos com mudança de solvente aos 5 minutos. Em seguida as superfícies foram polidas de modo idêntico ao carbono vítreo, utilizando as granulometrias 5 e 1 µm com sonificações em etanol-água (1:1) durante 3 minutos. Após polimentos e remoção completa do pó de carbono gerado, procedeu-se a uma última sonificação apenas em água durante 15 minutos com subsequente secagem em corrente de azoto.

2.3.2. Síntese de nanopartículas de magnetite (Fe₃O₄)

As nanopartículas de magnetite utilizadas foram sintetizadas pelo grupo de Química do Estado Sólido utilizando um método de precipitação que consistiu na adição de hidróxido de amónio a uma mistura de sais de Fe(II) e Fe(III)^[68]. De modo a obter a dimensão desejada o material precipitado foi colocado numa autoclave a uma temperatura de 200 °C por 24 horas. Tal como é apresentado na figura 2.3, as nanopartículas foram caracterizadas^[64] por difração de raios-X (XRD), revelando o padrão típico e bem definido da estrutura da magnetite, assim como por microscopia eletrónica de transmissão (TEM). Publicações anteriores dos grupos de Eletroquímica Interfacial e Química do Estado Sólido^{[64],[69]} revelam que as partículas com 40 nm de dimensão média apresentam propriedades catalíticas superiores a nanopartículas preparadas de modo semelhante mas com tamanho médio inferior (20 nm), tendo sido selecionadas, por esse motivo, para incorporar na modificação de eletrodos realizada neste trabalho.

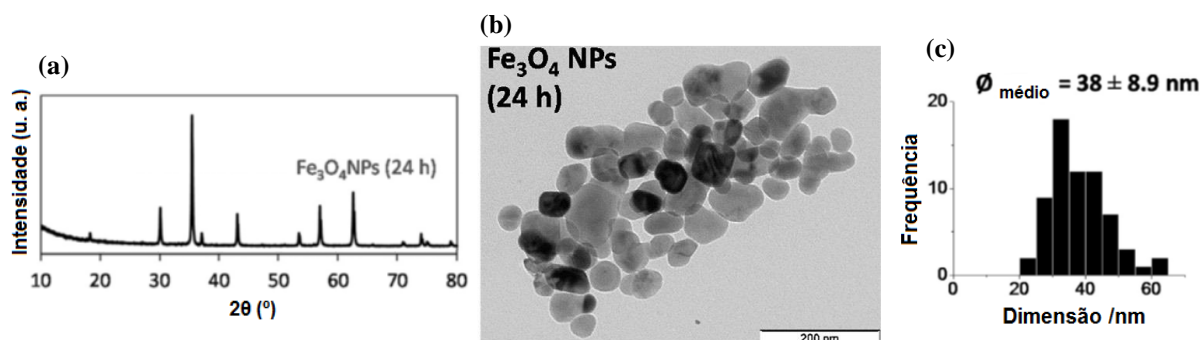


Figura 2.3: Difratoograma de raios-X de pós (a) e imagem TEM (b) das nanopartículas de magnetite com dimensão média 40 nm (c) – adaptado de [64].

2.3.3. Modificação das superfícies com PDA, Lacase e Fe_3O_4 -NPs

Foram implementados dois métodos principais para a modificação das superfícies de carbono baseadas em polidopamina como agente de imobilização. No método A (figura 2.4) a imobilização de lacase e/ou nanopartículas de magnetite é efetuada após a formação do filme de polidopamina, testando a química superficial do filme ao evitar os processos físicos de aprisionamento ou encapsulamento. No método B (figura 2.5) a imobilização ocorre simultaneamente à polimerização maximizando as quantidades de material catalítico.

2.3.3.1. Método A

No primeiro passo, o substrato de carbono previamente limpo foi coberto por um filme fino de polidopamina crescido quimicamente ou eletroquimicamente. Para providenciar uma polimerização espontânea, o substrato foi submerso numa solução de 10 mM de dopamina tamponada a pH 8,5 (Tris-HCl) durante 1, 8 ou 14 hora, à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), sem recorrer a oxigenação ou agitação. No caso da eletro-polimerização, o crescimento potenciodinâmico foi otimizado para decorrer a 200 mV/s, durante 3 ciclos, entre -0,6 e 0,8V (vs. SCE) e com o eletrólito desoxigenado, tamponado a pH 7,0 (CPB) contendo 10 mM de dopamina. Após polimerização os substratos modificados quimicamente (Carbono/PDA) e electroquimicamente (Carbono/ePDA) foram lavados com água e secos em corrente de azoto.

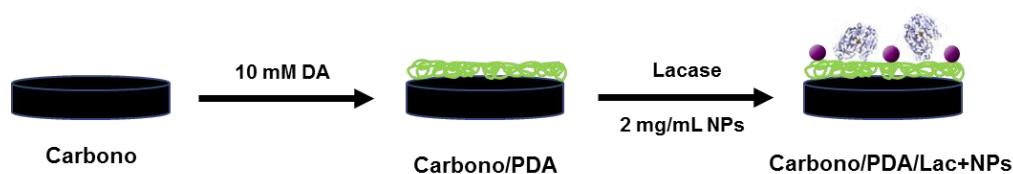


Figura 2.4: Esquema da preparação do eléctrodo modificado carbono/PDA/Lac+NPs segundo o método A.

No segundo passo, 2 mg/mL de nanopartículas (Fe_3O_4) foram suspensas no preparado de lacase (NovoZyme; pH = 8,0) recorrendo a 10 minutos de vibração ultrassónica num banho de água (35 kHz; Elma Transsonic T460/H). A mistura de lacase e nanopartículas foi colocada sobre o substrato modificado numa quantidade aproximada de $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$, garantindo uma superfície totalmente coberta. O processo de imobilização decorreu dentro de uma caixa de Petri fechada, de forma a evitar secagem total, durante 3 horas à temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Quando foi necessário cobrir duas faces

opostas, o elétrodo permaneceu apoiado obliquamente ($<10^\circ$) ao fundo da caixa de Petri, permitindo alojar parte da mistura em contacto com a face inferior. Após imobilização, o elétrodo modificado carbono/PDA/Lac+NPs foi lavado abundantemente com água e seco em corrente de azoto.

2.3.3.2. Método B

Primeiro procedeu-se à funcionalização das nanopartículas através da polimerização espontânea da dopamina. Numa alíquota de 150 μL do preparado de lacase (NovoZyme; $\text{pH} = 8,0$) foram dispersas 0,6 mg de nanopartículas recorrendo a 10 minutos de vibração ultrassónica (35 kHz). Noutra alíquota igual à primeira foram dissolvidos 0,5 mg de dopamina, juntando-se rapidamente à dispersão anterior. A polimerização da dopamina (10 mM) na presença das nanopartículas (2 mg/mL) e lacase decorreu durante 1 hora, à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e com uma agitação aos 30 minutos.

No passo seguinte, a mistura reacional anterior foi agitada e colocada sobre o substrato nas mesmas quantidades e condições do método A, excetuando a duração que no caso foi 1 hora. Após polimerização, o elétrodo modificado carbono/PDA+Lac+ Lac&PDA@NPs foi lavado abundantemente com água e seco em corrente de azoto.

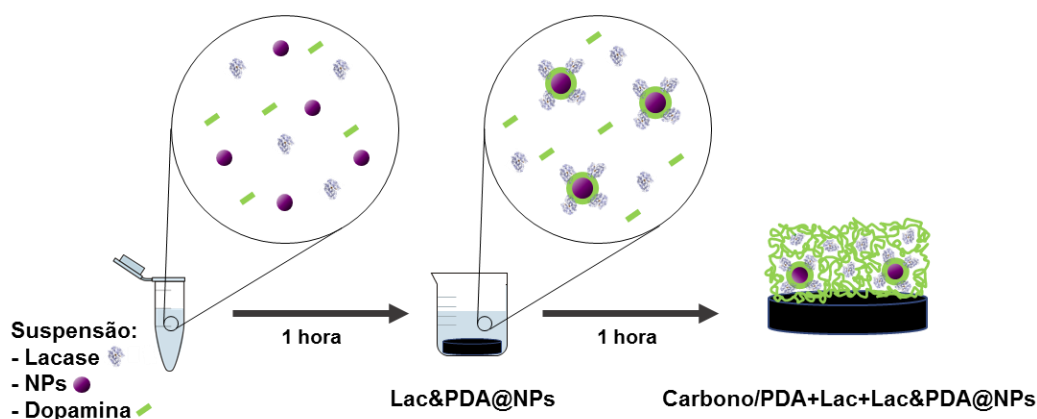


Figura 2.5: Esquema da preparação do elétrodo modificado carbono/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs segundo o método B.

2.4. Técnicas de Caracterização

2.4.1. Elipsometria

No início do século XX, o conhecimento da ótica da luz polarizada permitiu pela primeira vez a medição de filmes finos sobre superfícies metálicas por uma técnica denominada elipsometria^[70]. Esta técnica, historicamente relacionada à modificação eletroquímica de superfícies, baseia-se na medição do estado de polarização da luz refletida por uma superfície, permitindo assim deduzir características estruturais de um material – consequência das propriedades óticas – e ainda estimar a espessura de um eventual filme presente na superfície do mesmo. O modo como a luz interage com um material simples é função da sua permissividade elétrica ($\hat{\epsilon}$) ou índice refração (\hat{n}) complexos, relacionáveis entre si pela equação 2.1. No caso de um material transparente ($k = \epsilon_2 = 0$) ambas as grandezas complexas tomam os valores reais da constante dielétrica (ϵ_1) e do índice de refração real (n). Enquanto que a constante dielétrica se trata de um fator de atenuação do vetor de campo elétrico da luz no material relativamente ao vácuo ($\epsilon_1 = \epsilon/\epsilon_0$), o índice de refração real (ou densidade ótica) descreve a velocidade relativa da luz no material relativamente ao vácuo ($n = c/v$).

$$\hat{\varepsilon} = \hat{n}^2 \Leftrightarrow \varepsilon_1 + i\varepsilon_2 = (n + ik)^2 \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde:

- $\hat{\varepsilon}$, é a permissividade elétrica complexa;
- ε_1 , é a permissividade elétrica real ou constante dielétrica relativa;
- ε_2 , é a permissividade imaginária;
- \hat{n} , é o índice de refração complexo;
- n , é o índice de refração real;
- k , é o coeficiente de extinção;

No caso em que o material é absorvedor ($k \neq \varepsilon_2 \neq 0$) as duas grandezas óticas tomam necessariamente uma parte real e imaginária, elevando o esforço necessário ao tratamento matemático dos dados elipsométricos. A parte imaginária da permissividade elétrica relaciona-se com a dissipação de energia após interação eletromagnética com o material, enquanto que a parte imaginária do índice de refração (k) relaciona-se diretamente com a absorvidade do mesmo ($\alpha = 4\pi k/\lambda$). Esta interação da luz com a superfície do material será ainda mais complexa se a sua estrutura apresentar uma permissividade elétrica preferencial por um ou vários eixos tridimensionais (anisotropia). Este fenómeno pode ser observado pela variação de $\hat{\varepsilon}$ ou \hat{n} a diferentes ângulos de incidência e requer um tratamento matemático mais exigente envolvendo tensores. Por esse motivo a superfície de partida, também denominada substrato, deverá ser preferencialmente o mais próxima possível de uma superfície idealmente lisa, homogênea e isotrópica.

Definida como a orientação do vetor de campo elétrico (E) e ao longo do tempo, a polarização é uma propriedade característica das ondas eletromagnéticas. Ao interagir com a matéria o estado de polarização da luz é perturbado^[71]. Tirando partido desta interação com a superfície, uma medição elipsométrica envolve a emissão de um feixe de luz polarizada, com comprimento de onda conhecido, em direção à amostra segundo um ângulo de incidência (φ_0) fixo (figura 2.6). Ambas as componentes da luz incidente paralela (E_{ip}) e perpendicular (E_{is}) ao plano de incidência (POI) são refletidas alterando de intensidade de acordo com as propriedades óticas da superfície. A luz refletida, com polarização tipicamente elíptica, passa a ser definida por duas novas componentes paralela (E_{rp}) e perpendicular (E_{rs}).

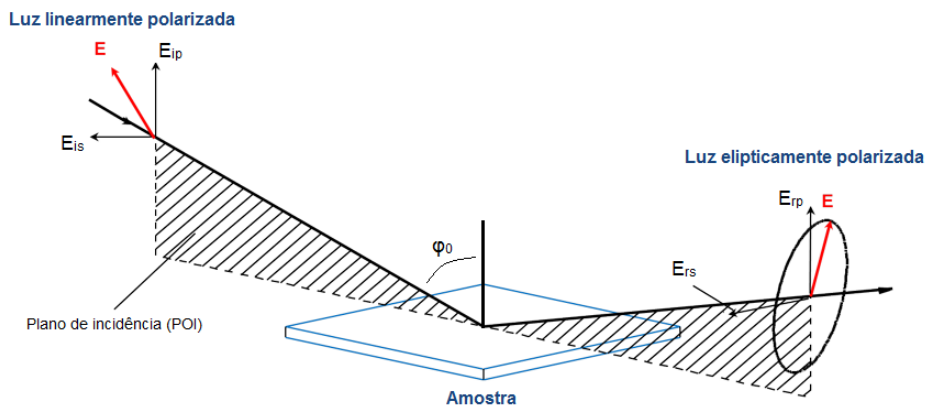


Figura 2.6: Reflexão numa superfície plana das componentes paralela (E_{ip}) e perpendicular (E_{is}) ao plano de incidência (POI), da luz polarizada – adaptado de [70].

Pelas equações de Fresnel (eq. 2.2 e eq. 2.3) as componentes da luz imitada e refletida podem então ser correlacionadas com o índice de refração complexo do material. No entanto a definição do estado de polarização através de componentes ortogonais ao plano de incidência é apenas a forma cartesiana de representação. Experimentalmente as alterações ao estado de polarização são medidas pela

diferença de fase Δ e ângulo azimutal Ψ , também denominados por ângulos elipsométricos, que são função da geometria da elipse definida pela extremidade do vetor campo elétrico em rotação. Por intermédio do coeficiente complexo de reflexão (ρ) as medições experimentais são correlacionáveis com as propriedades óticas da superfície pela equação fundamental da elipsometria (equação 2.4).

$$\hat{r}_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = \frac{\hat{n}_1 \cos \varphi_0 - n_0 \cos \varphi_1}{\hat{n}_1 \cos \varphi_0 + n_0 \cos \varphi_1} \quad (\text{Equação 2.2})$$

$$\hat{r}_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = \frac{n_0 \cos \varphi_0 - \hat{n}_1 \cos \varphi_1}{n_0 \cos \varphi_0 + \hat{n}_1 \cos \varphi_1} \quad (\text{Equação 2.3})$$

$$\rho(n_0, \hat{n}_1, \varphi_0, \lambda) = \frac{\hat{r}_p}{\hat{r}_s} = \tan \Psi e^{i\Delta} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Onde:

- \hat{r}_p e \hat{r}_s , são os coeficientes de reflexão de Fresnel complexos paralelo (p) e perpendicular (s);
- E_{rp} e E_{rs} , são as componentes paralela (p) e perpendicular (s) do vetor campo elétrico da luz refletida (r);
- E_{ip} e E_{is} , são as componentes paralela (p) e perpendicular (s) do vetor campo elétrico da luz incidente (i);
- n_0 e \hat{n}_1 , são os índices de refração do ar ambiente (0) e do substrato (1);
- φ_0 e φ_1 , são os ângulos incidente (0) e de propagação da luz no material em estudo (1); $\hat{n}_1 \sin \varphi_1 = n_0 \sin \varphi_0$;
- λ , é o comprimento de onda;
- Ψ , é o ângulo azimutal;
- Δ , é a diferença de fase.

No caso do material liso, homogêneo e isotrópico apresentado na figura 2.6, a obtenção das propriedades óticas é trivial pela resolução analítica da equação 2.4. Quando o coeficiente complexo de reflexão é dependente de um número maior de variáveis desconhecidas do que ângulos elipsométricos Ψ e Δ medidos e as propriedades óticas não podem ser estimadas desta forma. Este problema pode ser resolvido utilizando outras técnicas para aumentar o número de parâmetros óticos conhecidos, ou ainda por múltiplas medições variando ângulo de incidência ou comprimento de onda, como é o caso particular da elipsometria espectroscópica. Para o modelo ótico comum de um filme isotrópico de parâmetros desconhecidos (n , k , L) sobre um substrato de parâmetros conhecidos (figura 2.7), surge a impossibilidade de estimar as propriedades do filme com uma única medição elipsométrica.

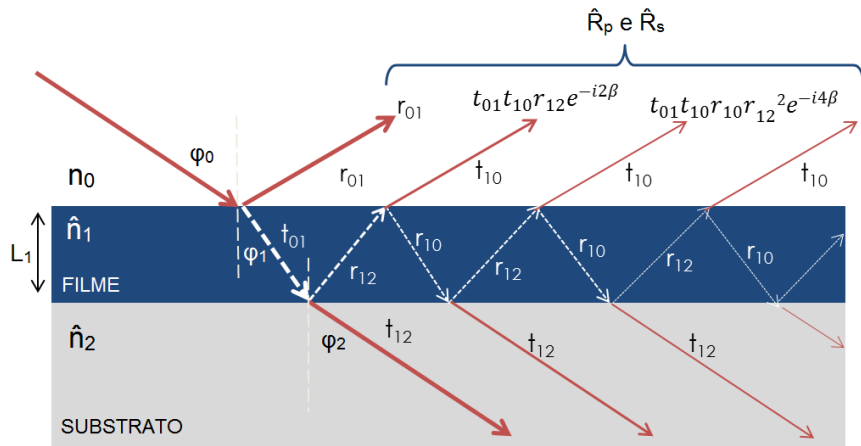


Figura 2.7: Eventos de reflexão (r_{mn}) e transmissão (t_{mn}) da luz polarizada no modelo de 3 fases isotrópicas: substrato semi-infinito (n_2 , k_2), filme fino (n_1 , k_1 , L_1) e ambiente (n_0) – adaptado de [72].

A introdução de uma camada isotrópica sobre o substrato implica a modificação do coeficiente complexo de reflexão (ρ) de modo a ter em conta as várias reflexões e refrações que ocorrem no seio do filme. As resultantes são dadas pelas equações 2.5 e 2.6 que para além de dependerem de quatro

coeficientes de Fresnel (r_{mnl}) introduzem um novo fator de fase β (equação 2.7) dependente da espessura do filme (L_1).

$$\hat{R}_p = \frac{\hat{r}_{01p} + \hat{r}_{12p} e^{-i2\beta}}{1 + \hat{r}_{01p} \hat{r}_{12p} e^{-i2\beta}} \quad (\text{Equação 2.5})$$

$$\hat{R}_s = \frac{\hat{r}_{01s} + \hat{r}_{12s} e^{-i2\beta}}{1 + \hat{r}_{01s} \hat{r}_{12s} e^{-i2\beta}} \quad (\text{Equação 2.6})$$

$$\beta = \frac{2\pi L_1}{\lambda} \sqrt{\hat{n}_1^2 - n_0^2 \sin^2 \varphi_0} \quad (\text{Equação 2.7})$$

Onde:

- \hat{R}_p e \hat{R}_s , são as resultantes de reflexão complexas paralela (p) e perpendicular (s);
- \hat{r}_{mnl} , são os coeficientes complexos de Fresnel das interfaces m, n com orientação l ;
- β , é o fator de fase;
- L_1 , é a espessura do filme isotrópico (1);
- λ, n_0, \hat{n}_1 e φ_0 , são variáveis descritas na legenda da equação 2.4.

O avanço da elipsometria como técnica de análise rápida está dependente da evolução de software de utilização fácil preparado para modelos complexos^[73]. No seguimento da necessidade computacional em ajustar modelos óticos e para que a tarefa fosse facilitada, foi desenvolvido um *software* de simulação elipsométrica com resultados práticos na determinação das propriedades óticas de filmes de polidopamina (figura 2.8a). O código-fonte foi escrito em linguagem de programação C++ adaptado à interface gráfica dos formulários do *Windows*, recorrendo ao compilador *Microsoft Visual Studio 2013*. Este *software* permite realizar um ajuste multiangular de quatro pares (Ψ, Δ) experimentais, a um modelo ótico de um filme com três ou menos camadas isotrópicas e onde o substrato e camada ambiente são necessariamente conhecidas. Uma utilização típica passa pela introdução dos dados experimentais, definir os intervalos de procura e selecionar o tipo de resultados pretendido. Antes de iniciar o ajuste, o utilizador poderá aceder a “Ficheiro>Guardar parâmetros...” de modo exportar os dados experimentais e opções do ajuste para um ficheiro de texto (figura 2.8b). Ao clicar em “Calcular” será perguntada a localização e nome que se pretende dar aos ficheiros de resultados. Iniciando o cálculo, o progresso poderá ser acompanhado pela barra de estado no canto inferior esquerdo da janela e pode ser cancelado a qualquer altura. No final uma janela informa quais os parâmetros que melhor se ajustaram aos ângulos elipsométricos experimentais (figura 2.8c). Os resultados serão guardados em vários ficheiros de texto que podem ser facilmente importados para uma folha de cálculo. Após o encerramento e reabertura do programa o utilizador poderá aceder a “Ficheiro>Abrir parâmetros...” de modo a reajustar o modelo, realizar alterações aos limites impostos ou apenas visualizar os dados experimentais.

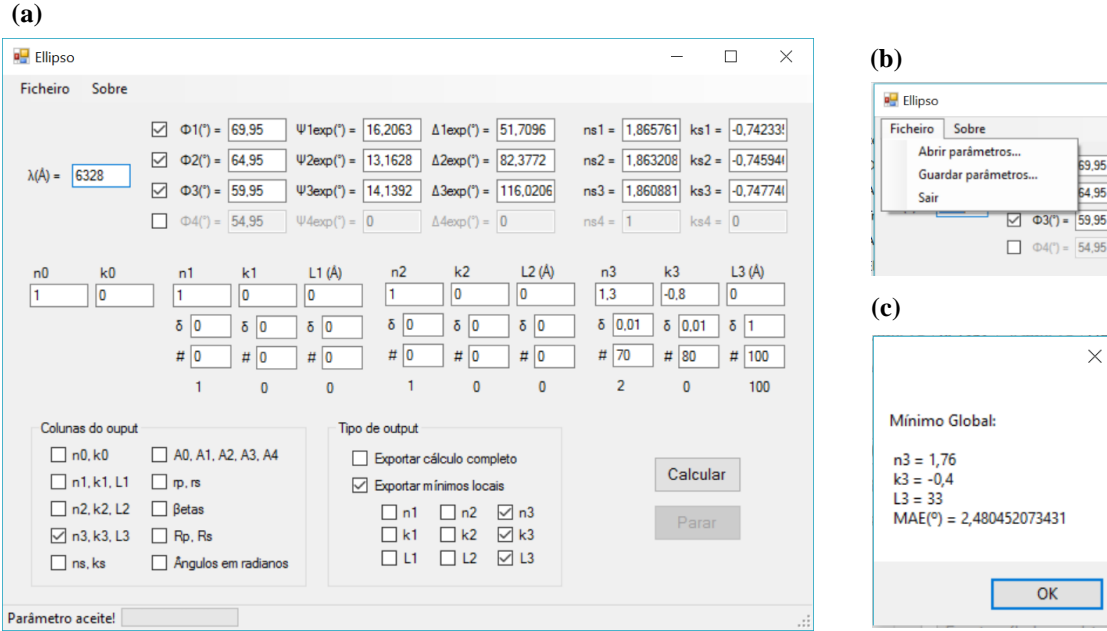


Figura 2.8: Capturas de ecrã do *software* desenvolvido para os ajustes elipsométricos: janela principal (a), opções de importação e exportação (b) e janela informativa do mínimo global encontrado (c).

Em termos do formalismo necessário ao funcionamento do *software*, foram transcritas para o código-fonte seis equações de Fresnel (r_{mnl}), oito equações de reflexões resultantes (R_{mn}), três fatores de fase (β_n) e a equação fundamental da elipsometria (ρ). Para além disso todas as operações matemáticas foram separadas na parte real e imaginária de modo a que o código lidasse sempre com variáveis reais. Por último, o erro absoluto multiangular (MAE) que traduz a distância cartesiana entre dois pontos (Ψ , Δ), foi utilizado para minimizar o ajuste do modelo aos dados experimentais através da equação 2.8.

$$MAE = \sum_{i=1}^N \sqrt{(\Psi_{\text{calc}} - \Psi_i)^2 + (\Delta_{\text{calc}} - \Delta_i)^2} \quad (\text{Equação 2.8})$$

Onde:

- MAE , é o erro absoluto multiangular em graus ($^{\circ}$);
- N , é o número de ângulos de incidência (ou pares Ψ, Δ);
- Ψ_{calc} e Δ_{calc} , são os ângulos elipsométricos calculados (azimutal e diferença de fase);
- Ψ_i e Δ_i , são os i -ésimos ângulos elipsométricos experimentais (azimutal e diferença de fase).

Experimentalmente efetuaram-se medições elipsométricas *ex-situ*, aos ângulos de incidência 60° , 65° e 70° , recorrendo ao elipsómetro SENTECH Instruments GmbH SE400 na configuração PSA (*polarizer, sample, analyser*) controlado por um computador. Para uma elevada reprodutibilidade das leituras, cada medição envolveu 10 rotações do analisador e um feixe de luz monocromática proveniente de um laser He-Ne ($\lambda = 632,80$ nm).

2.4.2. Goniometria de Ângulo de Contacto

Usualmente a hidrofiliicidade ou hidrofobicidade da superfície de materiais é avaliada pela goniometria direta (medição de ângulo) de gotas colocadas em contacto com a superfície a estudar^[74]. Ao recorrer a métodos óticos para medir o ângulo tangente ao contorno de uma gota, é possível avaliar rapidamente a hidrofiliicidade do material. A forma e ângulo formados pela gota em contacto dependerá das três tensões superficiais como se pode observar para o caso de uma gota estática (ou séssil) e em

equilíbrio da figura 2.9. Qualitativamente, quando uma gota de água molha e se espalha na superfície ($\theta_c < 90^\circ$) classifica-se o material como hidrofílico, enquanto que na situação inversa em que a gota não molha ou é repelida pela superfície ($\theta_c > 90^\circ$) o material diz-se hidrofóbico.

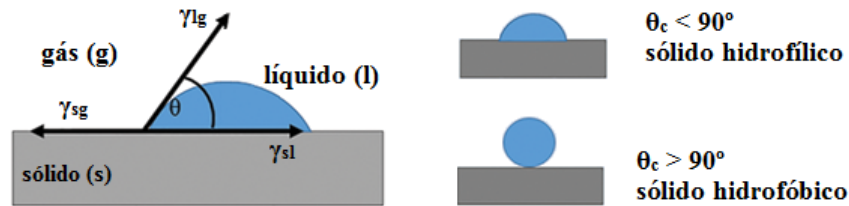


Figura 2.9: Ângulos de contacto formados por uma gota séssil numa superfície lisa e homogénea – adaptado de [75].

A relação ideal entre o ângulo de contacto e as tensões superficiais é dada pela equação de Young (equação 2.9)^[76] que assume interações numa superfície lisa e homogénea. Apesar da determinação do ângulo de contacto ser experimentalmente simples, apenas a diferença $\gamma_{sg} - \gamma_{sl}$ pode ser estimada diretamente. Para retirar informação útil sobre a tensão superficial do sólido (γ_s) é necessário recorrer a cálculos não triviais e a ensaios com diferentes tipos de líquidos^[77]. Ainda assim, a medição ótica direta do ângulo de contacto de gotas de água estáticas, é útil na avaliação rápida da hidrofilicidade de superfícies requerendo pequenos volumes de líquido.

$$\gamma_{lg} \cos \theta_Y = \gamma_{sg} - \gamma_{sl} \quad (\text{Equação 2.9})$$

Onde:

- θ_Y

- γ_{lg} , γ_{sg} e γ_{sl} , são as tensões interfaciais líquido-vapor (lg), sólido-vapor (sg) e sólido-líquido (sl) em $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$.

Em termos experimentais foi utilizado o medidor KRÜS DSA30, para a obtenção das imagens de 10 gotas de água estáticas (1 μL). Posteriormente, a análise da forma de gota foi realizada no *software ImageJ* recorrendo ao ajuste automático do plugin *DropSnake*^[78].

2.4.3. Microscopia de Força Atômica

Acompanhando a tendência tecnológica direcionada para a nano-escala, surge o advento das microscopias com resolução atômica^[79]. Em particular, as microscopias de varrimento de sonda (*Scanning Probe Microscopy*, SPM) baseadas na interação de uma ponta atómicamente afiada com a superfície, permitem ir para além da obtenção de imagem, controlando matéria na escala nanométrica ou na escala atômica. Essencialmente, distinguem-se duas SPMs pela medição de diferentes grandezas da ponta: a microscopia de efeito de túnel (*Scanning Tunneling Microscopy*, STM) – onde a informação topográfica advém da medição da corrente de túnel – e a microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) – onde a informação topográfica e mecânica advém da medição da força exercida na ponta. O AFM é a técnica dominante pela sua versatilidade em analisar amostras independentemente da sua condutividade e em diversos modos de operação^[80]. Por um mecanismo retroativo (*feedback*), a imagem topográfica é gerada ao manter constante a interação entre a ponta do cantiléver e a superfície, enquanto são variados os dois sentidos horizontais x e y (figura 2.10). Para manter essa interação constante, a posição vertical da amostra (z) é ajustada consoante a informação recebida acerca da

deflexão ou oscilação do cantiléver que, por sua vez, é obtida pela detecção no fotodíodo de um feixe de luz refletido na parte superior do mesmo.

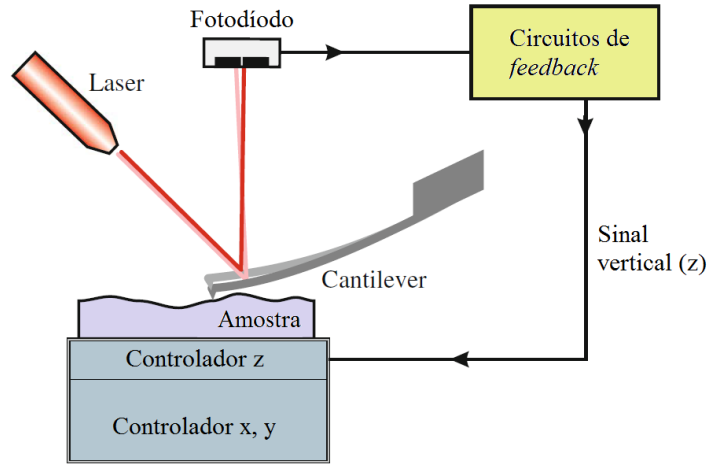


Figura 2.10: Esquema do mecanismo retroativo de obtenção de imagem na microscopia de força atômica (AFM) – retirado de [79].

Dependendo da proximidade entre ponta e superfície, a interação pode ser dividida em duas partes: a região de força repulsiva (mais próxima) e a região de força atrativa (menos próxima). Tirando partido da força repulsiva forte, o modo de operação de contacto (*contact mode*) permite rápidas velocidades de varrimento com resolução atômica em superfícies lisas e não deformáveis. Neste modo a informação topográfica é obtida pelo controlo na deflexão do cantiléver, ou seja, a força constante. Para além deste modo estático, existem os modos dinâmicos que operam na região de força atrativa e previnem a deformação definitiva da amostra e a contaminação da ponta. Em ambos os modos de não-contacto (*noncontact mode*) e de contacto intermitente (*tapping mode*) o cantiléver oscila a uma distância maior da superfície o que os torna indicados para analisar superfícies macias, como polímeros, material biológico, entre outros. Apesar disso, o modo de não-contacto em geral está limitado a superfícies hidrofóbicas ou a ambientes de ultra-alto vácuo onde a camada naturalmente adsorvida de fluido à superfície é pequena ou inexistente. Por outro lado, o modo de contacto intermitente, onde a oscilação ocorre mais próxima da superfície, apresenta maior resolução lateral, a possibilidade de operar ao ar ambiente e a capacidade de analisar materiais macios.

Um parâmetro possível de estimar por microscopia de força atômica é a rugosidade da superfície, avaliando as diferenças de altura de proeminências e depressões na superfície. Vários tratamentos matemáticos podem ser empregues no cálculo da rugosidade, no entanto a rugosidade quadrática média (R_q , R_{RMS} ou RMS) é a que habitualmente se utiliza pela sua simplicidade e por corresponder a um desvio padrão à média de alturas^[79]. O cálculo do R_q trata-se inclusive de uma análise automatizada nos *softwares* de controlo dos AFM, e que se traduz na equação 2.10^[81].

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - \bar{Z})^2}{N}} \quad (\text{Equação 2.10})$$

Onde:

- R_q , é a rugosidade média quadrática numa dada área;
- N , é o número de pontos;
- Z_i , é a altura no ponto i ;
- \bar{Z} , é a altura média da área em questão.

No âmbito deste trabalho, recorreu-se ao modo de contacto intermitente (*tapping mode*), a velocidades de varrimento de *ca.* 1,7 Hz, do microscópio de força atómica Nanoscope IIIa Multimode (DI Veeco) para recolher imagens topográficas ao ar das superfícies de carbono antes e após modificações. Foram ainda utilizadas pontas de prova de silício (TESP, Bruker) com uma constante de força de *ca.* 42 N·m⁻¹ e com uma frequência de ressonância típica de 300 kHz.

2.4.4. Voltametria Cíclica e Cronoamperometria

Para estudar as reações de eléctrodo recorreu-se, neste trabalho, a duas técnicas eletroquímicas: voltametria cíclica (CV) e cronoamperometria (CA). A voltametria cíclica enquadra-se nas técnicas de varrimento de potencial linear, onde o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho varia a uma velocidade constante de varrimento v (mV/s) entre dois valores fixos (figura 2.11a). Cada ciclo de varrimento de potencial é constituído por um segmento anódico e outro catódico, aos quais se fazem corresponder um segmento de corrente de oxidação e um segmento de corrente de redução no voltamograma consequente (figura 2.11b). Diferente informação termodinâmica, cinética e analítica pode ser retirada a partir de ensaios voltamétricos tais como potenciais redox, reversibilidade, limitações cinéticas e ainda atividade enzimática.

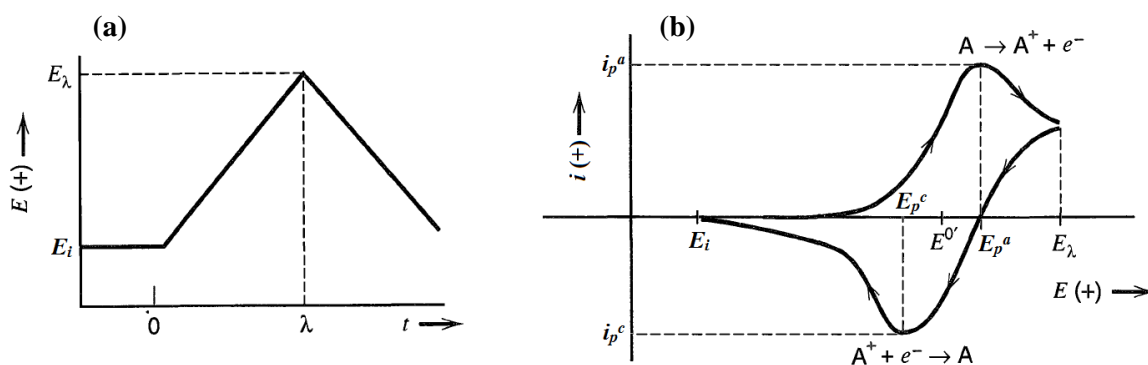


Figura 2.11: Ciclo de varrimento linear do potencial aplicado com inversão de sentido no tempo λ (a) e voltamograma típico de uma transferência eletrónica reversível – adaptado de [82].

No exemplo da conversão redox reversível $A \rightleftharpoons A^+ + e^-$, são esperados dois picos de corrente de igual intensidade, correspondentes ao processo anódico (i_p^a , oxidação) e catódico (i_p^c , redução), e que ocorrem aos respetivos potenciais de pico anódico (E_p^a) e catódico (E_p^c). O potencial formal ($E^{0'}$) que caracteriza o par redox em termos termodinâmicos, pode ser estimado (assumindo coeficientes de difusão semelhantes das espécies envolvidas no processo redox) através da média entre os dois potenciais de pico ($E^{0'} \approx E_{1/2} = (E_p^c + E_p^a)/2$). Para além deste processo ideal de comportamento Nernstiano, existem ainda os comportamentos *quasi*-reversível e totalmente irreversível cujas transferências eletrónicas entre espécies e superfície do eléctrodo podem ser um passo limitante. A confirmação empírica destes comportamentos é realizada por um quociente $|i_p^a/i_p^c|$ diferente da unidade, por uma separação entre potenciais de pico maior que 59/n mV e pela dependência entre os potenciais de pico e a velocidade de varrimento de potencial.

Para além da reversibilidade que avalia a transferência eletrónica entre espécies e eléctrodo, a voltametria cíclica permite igualmente avaliar a influência de outros passos importantes nas reações de eléctrodo intrinsecamente heterogéneas. Prevista pela equação de Randles-Sevcik (equação 2.11)^[82], a linearidade entre a densidade de corrente de pico (j_p) e a raiz da velocidade de varrimento de potencial

($v^{1/2}$) confirmam que um processo de eletrodo está limitado pelo passo de difusão das espécies, ou seja, as espécies eletroativas encontram-se em solução.

$$j_p = 0,4463 C_O^* \left(\frac{n^3 F^3 D_O v}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{Equação 2.11})$$

Onde:

- j_p , é a densidade de corrente de pico em $A \cdot cm^{-2}$;
- C_O^* , é a concentração da espécie O no seio da solução em $mol \cdot cm^{-3}$;
- n , é o número de elétrons envolvidos;
- F , é a constante de Faraday ($96485,3399 C \cdot mol^{-1}$)^[83];
- D_O , é o coeficiente de difusão da espécie O em $cm^2 \cdot s^{-1}$;
- v , é a velocidade de varrimento de potencial em $V \cdot s^{-1}$;
- R , é a constante dos gases perfeitos ($8,314472 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)^[83];
- T , é a temperatura em K.

No caso em que as espécies redox se encontram adsorvidas à superfície do eletrodo, é esperado que a separação entre potenciais de pico seja nula ($\Delta E_p = 0$) uma vez que não existe um passo de transporte de massa a limitar a corrente. Considerando que o processo é então controlado por transferência de carga, prevê-se uma relação linear entre a densidade de corrente de pico (j_p) e velocidade de varrimento de potencial (v) descrita pela equação 2.12^[84]. Conhecendo o número de elétrons envolvido este as espécies adsorvidas e o eletrodo pode inclusive estimar-se o recobrimento superficial destas espécies (Γ).

$$j_p = \frac{n^2 F^2 \Gamma}{4RT} v \quad (\text{Equação 2.12})$$

Onde:

- j_p , n , F , R , T e v , são parâmetros descritos na legenda da equação 2.11;
- Γ , é o recobrimento superficial em $mol \cdot cm^{-2}$;

Ao contrário da voltametria cíclica onde o potencial aplicado variava linearmente, na cronoamperometria o potencial é fixado num determinado valor durante um determinado intervalo de tempo (figura 2.12a). À medida que a corrente de resposta é registada ao longo do tempo, gera-se um cronoamperograma onde a corrente segue tipicamente um decaimento em função de $t^{1/2}$ concordante com a equação de Cottrell^[82] (figura 2.12b). Assim que um pulso de potencial é aplicado, ocorre a depleção imediata de espécies eletroativas junto à superfície do eletrodo sendo desenvolvido um gradiente de concentração. Uma vez estabelecida a camada de difusão, a corrente patamar (a um dado tempo de ensaio) pode ser correlacionada com a concentração da espécie em solução, tratando-se de uma técnica eletroquímica com importância analítica^[85].

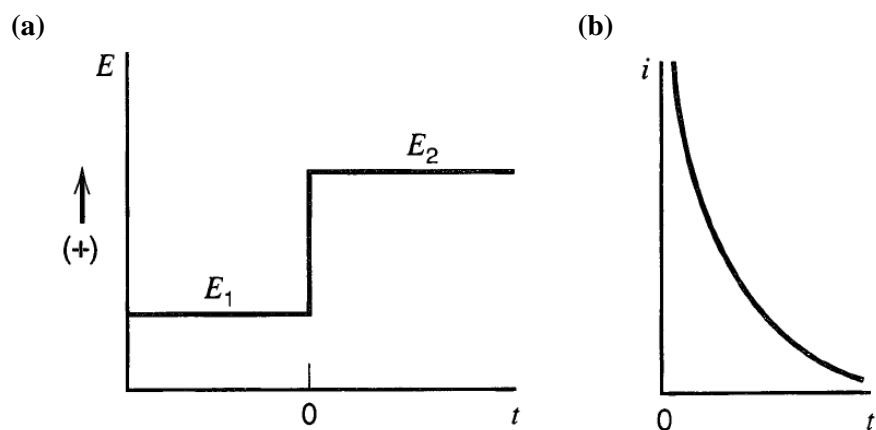


Figura 2.12: Pulso simples de potencial (a) e corrente de resposta típica (b) num ensaio cronoamperométrico – adaptado de [82].

Experimentalmente, ao longo deste trabalho, as técnicas eletroquímicas foram controladas pelo potencióstato CHI600A Electrochemical Analyzer, utilizando um sistema de 3 eléctrodos (ver secção 2.2) protegido por uma caixa de Faraday.

Capítulo 3

Filmes de polidopamina crescidos em
carbono

3. Filmes de polidopamina crescidos em carbono

3.1. Caracterização de filmes de polidopamina formados espontaneamente

Como referido anteriormente, a polidopamina tem sido um material recentemente investigado graças às suas propriedades adesivas, biocompatibilidade e facilidade de preparação^[36]. Para além disso a existência de grupos quinona prontos a imobilizar enzimas ou nanoestruturas, tornou a polidopamina como uma matriz atrativa para a criação de biossensores neste trabalho.

A metodologia mais reportada para a formação de filmes de polidopamina baseia-se na polimerização espontânea da dopamina em meio alcalino, publicada relativamente a substratos de ouro^[86], silício^{[44],[87],[88],[89]}, carbono^[90], variadas membranas^{[91],[92]}, entre outros^{[37],[36],[93],[94],[95]}. Neste trabalho, um estudo exaustivo das propriedades de filmes de polidopamina foi levado a cabo em carbono vítreo pela sua compatibilidade com várias técnicas de caracterização, nomeadamente voltametria cíclica, elipsometria, AFM, goniometria de ângulos de contacto, e ainda pela sua semelhança química com a grafite. A utilização sequencial destas técnicas permitiu obter informação detalhada sobre a superfície do carbono antes e após modificação, sem destruir os filmes de polidopamina durante o processo. De modo a prevenir alterações químicas ou físicas, as caracterizações eletroquímicas foram realizadas sempre em último lugar, enquanto que as restantes técnicas seguiram a sequência: elipsometria → goniometria → AFM. Seguindo as condições da polimerização espontânea descrita no método A (secção 2.3.3.1), foram crescidos filmes de PDA sobre carbono vítreo, variando o tempo de polimerização: 1, 8 e 14 horas. Após lavagem com água e secagem em corrente de azoto, os eletrodos GC/PDA foram caracterizados.

3.1.1. Propriedades Óticas, Morfológicas e Hidrofilicidade

Previamente à modificação do carbono vítreo com filmes de polidopamina, pretendeu-se avaliar o estado superficial do mesmo através de múltiplos ensaios elipsométricos. Apesar do carbono vítreo ser um material conhecido pela sua baixa reatividade química^[96], o seu conteúdo superficial de oxigénio na forma de hidroxilos, carbonilos, éteres e ésteres, varia consoante o tratamento ou limpeza realizada^{[66],[97]}. Após realizar sucessivas limpezas em diferentes dias, seguindo o procedimento descrito na secção 2.3.1, mediram-se os parâmetros elipsométricos Ψ e Δ em diferentes pontos da superfície a 60°, 65° e 70° de ângulo de incidência. Como exemplo, é apresentada na figura 3.1 a carta de controlo relativa às medições realizadas a 70°, onde se observa uma distribuição aleatória em torno da média de ambos os parâmetros. Uma vez que poucos valores se aproximam dos limites de controlo ($\pm 3\sigma$) e nenhum os ultrapassa, pode concluir-se que o procedimento de limpeza é adequado para reproduzir uma superfície idêntica antes de cada reutilização. Caso ocorressem alterações significativas na química superficial do carbono, seriam observadas alterações nos seus parâmetros óticos^{[98],[99]}.

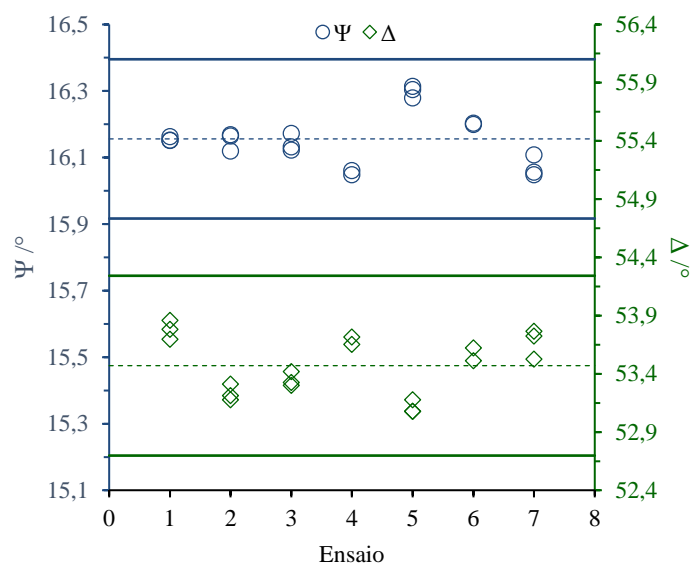


Figura 3.1: Carta de controle dos ângulos elipsométricos (Ψ e Δ) da superfície do carbono vítreo medidos a 70° ; linha tracejada representa o valor médio e linhas a cheio os limites de controle ($\pm 3\sigma$).

Relativamente às medições realizadas a 60° e 65° , constataram-se os mesmos comportamentos estatísticos, cujos valores médios se encontram reportados na tabela 3.1. Uma vez confirmada a reprodutibilidade da superfície do carbono vítreo, foram calculados os índices de refração (n_s) e coeficientes de extinção (k_s) respetivos a cada par (Ψ , Δ), a partir da equação 2.4 e estimados os valores médios (\bar{n}_s , \bar{k}_s) e desvios padrões associados. Não tendo sido encontradas variações significativas nas propriedades óticas do GC com a variação do ângulo de incidência, classifica-se este material como macroscopicamente isotrópico, ou seja, a sua permissividade elétrica (ϵ) é independente da direção em que a luz percorre o meio. Tal propriedade surge como consequência da aleatoriedade na disposição das fitas grafíticas nanométricas que compõem a estrutura do carbono vítreo^{[100],[101]} e tornam este material num suporte conveniente a estudos elipsométricos. Comparativamente com a literatura, os parâmetros óticos determinados são típicos de carbonos vítreos no comprimento de onda utilizado^{[66],[98],[99]}.

Tabela 3.1: Ângulos elipsométricos médios (Ψ e Δ) e parâmetros óticos calculados (n_s e k_s) do carbono vítreo com os respectivos desvios padrões ($n = 19$).

$\varphi / ^\circ$	$\bar{\Psi} / ^\circ$	$\bar{\Delta} / ^\circ$	\bar{n}_s	\bar{k}_s
70	$16,16 \pm 0,08$	$53,5 \pm 0,3$	$1,859 \pm 0,006$	$0,744 \pm 0,003$
65	$13,36 \pm 0,06$	$84,9 \pm 0,4$	$1,858 \pm 0,006$	$0,748 \pm 0,003$
60	$14,54 \pm 0,05$	$117,1 \pm 0,4$	$1,856 \pm 0,005$	$0,752 \pm 0,003$

De seguida a mesma superfície de carbono foi revestida por filmes de polidopamina seguindo o método A (2.3.3.1), onde se recorreu à polimerização espontânea da dopamina durante 1, 8 e 14 horas. Medições elipsométricas *ex-situ* das superfícies secas foram obtidas em triplicado, tal como resume a tabela 3.2. Pela análise comparativa dos parâmetros elipsométricos antes e após polimerização, é possível comprovar a alteração da superfície do carbono, o que corrobora com a deposição de filmes de polidopamina. Não só se mediram ângulos elipsométricos distintos após polimerização, como também se observou uma maior dispersão estatística comparativamente à dispersão resultante do processo de limpeza. Uma vez que a formação espontânea de filmes de polidopamina depende de múltiplos fatores experimentais (concentração, oxigenação, temperatura e duração) era expectável observar as variações

superficiais registadas. São igualmente observadas diferenças nos parâmetros elipsométricos quando diferentes tempos de polimerização são aplicados, no entanto a interpretação destes valores só é possível através da implementação de um modelo físico que se ajuste aos valores experimentais.

Tabela 3.2: Ângulos elipsométricos médios (Ψ e Δ) e respetivos desvios padrões ($n = 3$) das superfícies GC/PDA modificadas com diferentes tempos de polimerização (1, 8 e 14 h) e ângulos de incidência (60° , 65° e 70°).

	1 h		8 h		14 h	
$\varphi / ^\circ$	$\bar{\Psi} / ^\circ$	$\bar{\Delta} / ^\circ$	$\bar{\Psi} / ^\circ$	$\bar{\Delta} / ^\circ$	$\bar{\Psi} / ^\circ$	$\bar{\Delta} / ^\circ$
70	$16,7 \pm 0,6$	$51,9 \pm 0,3$	$16,9 \pm 0,4$	53 ± 2	$18,0 \pm 0,3$	$49,7 \pm 0,6$
65	$13,7 \pm 0,6$	$82,1 \pm 0,2$	$14,5 \pm 0,6$	81 ± 1	$14,6 \pm 0,4$	$76,9 \pm 0,3$
60	$14,5 \pm 0,5$	114 ± 2	16 ± 1	114 ± 2	$14,7 \pm 0,3$	$108,5 \pm 0,4$

Apesar de um grande número de publicações científicas reportar o uso de filmes de polidopamina^[36], nenhum estudo elipsométrico completo foi encontrado. De entre as publicações que utilizam dados elipsométricos no cálculo de espessuras^{[44],[87],[103]}, foram encontrados valores de n_{PDA} e k_{PDA} incongruentes. Assim sendo os três parâmetros óticos que caracterizam o filme de polidopamina (n_{PDA} , k_{PDA} , L_{PDA}) foram considerados desconhecidos, o que obriga à recolha de pelo menos dois pares (Ψ , Δ) alcançáveis pela variação do ângulo de incidência. No caso, três ângulos de incidência foram selecionados de modo a aumentar o significado real dos parâmetros ajustados. Utilizando o *software* de criação própria foram determinados os valores n_{PDA} , k_{PDA} e L_{PDA} que minimizam a diferença entre ângulos elipsométricos teóricos e experimentais, assumindo um modelo de filmes lisos, homogêneos e isotrópicos, composto por uma só camada. Apesar dos ensaios terem sido realizados em triplicado, os coeficientes de extinção (k_{PDA}) ajustados eram aleatórios, diferentes de ensaio para ensaio e independentes do tempo de polimerização. Simultaneamente constatou-se que grandes variações no k_{PDA} resultavam em pequenas alterações nos valores de n_{PDA} e L_{PDA} , tendo-se assim entendido que os k_{PDA} ajustados não refletiam um valor com significado físico. Na literatura este problema é resolvido fixando o coeficiente de extinção a zero (filme transparente)^[87], no entanto, a polidopamina absorve radiação com o comprimento de onda utilizado e por esse motivo será mais correto fixar o coeficiente de extinção num valor positivo^{[103],[104]}.

De modo a minimizar a dispersão dos resultados para cada tempo de polimerização, fixou-se um coeficiente de extinção de 0,4, resultando nos valores da tabela 3.3. A maior densidade ótica ajustada para o filme crescido durante 1 hora comparativamente com os filmes de longa polimerização, sugere uma estrutura mais densa na fase inicial de deposição comparativamente com o restante filme ($1,88 > 1,76$). Seria importante levar a cabo um maior número de crescimentos com tempos de polimerização menos espaçados de modo a descortinar, com maior detalhe, a variação de n com o tempo de polimerização. Note-se que independentemente do valor de k fixado (entre 0 e 0,8) os índices de refração para os filmes de 8 e 14 horas mantiveram-se idênticos e menores que o índice da camada mais fina. A mesma independência entre k fixado e o comportamento crescente da espessura com o tempo de polimerização foi constatada, o que confirma o crescimento dos filmes de polidopamina ao longo de 14 horas. Excluindo a primeira hora de polimerização, notou-se um decréscimo na velocidade média de crescimento de 0,7 nm/h (entre 1 e 8 horas) para 0,6 nm/h (entre 8 e 14 horas). O decréscimo observado é concordante com o estabelecimento de uma espessura patamar reportada para outros substratos^{[44],[87],[88]} e que ocorre devido ao facto da polimerização espontânea depender do oxigénio disponível em solução. Apesar do método utilizado não ser prático para obter filmes espessos (> 50 nm), ficou provada a possibilidade de obter filmes com espessuras distintas pelo controlo da duração de polimerização. Importa referir que recorrendo a múltiplas imersões, a outros oxidantes químicos ou ainda à eletropolimerização, é possível melhorar a velocidade de crescimento e consequentemente obter

filmes mais espessos. No entanto, para fins de transdução eletroquímica um filme semiconductor demasiadamente espesso não será vantajoso. Ao caracterizar filmes de polidopamina com alguns nanómetros pretende-se entender como variam as suas propriedades e a adequação em termos de matriz de suporte.

Tabela 3.3: Índices de refração e espessuras médias ($n = 3$) dos filmes de polidopamina crescidos durante 1, 8 e 14 horas, e respetivos erros de ajuste multiangular médio (\overline{MAE}). Coeficiente de extinção (k_{PDA}) foi fixado a 0,4.

Tempo de polimerização /h	\bar{n}_{PDA}	\bar{L}_{PDA} /nm	\overline{MAE} /°
1	$1,9 \pm 0,2$	3 ± 1	0,4
8	$1,76 \pm 0,02$	8 ± 1	0,9
14	$1,76 \pm 0,06$	11 ± 2	0,5

Como previsto anteriormente, as mesmas superfícies GC/PDA foram caracterizadas em termos das suas hidrofilicidades através da medição dos ângulos de contacto de gotas de água sésseis (figura 3.2). Enquanto que a superfície de GC polida é pouco hidrofílica e apresenta um ângulo de contacto elevado característico das superfícies de carbono^{[105],[106],[107]}, o seu revestimento com filmes de polidopamina com apenas alguns nanómetros tornou a superfície consideravelmente mais hidrofílica ($\theta_c \approx 50^\circ$). Contatou-se ainda não haver uma diferença significativa entre a hidrofilicidade duma superfície modificada com recurso a uma polimerização curta (1 h) ou longa (14 h). A inexistência duma dependência clara entre a hidrofilicidade do filme e o tempo de polimerização, não só aponta para uma homogeneidade semelhante nos três casos, como sustenta a utilização mais prática de polimerizações curtas. Mais adiante na discussão das propriedades eletroquímica destas interfaces, tornar-se-á mais clara a adequação do filme crescido durante 1 hora relativamente aos restantes.

Na literatura encontram-se alguns exemplos do uso de revestimentos de polidopamina como forma de alterar a hidrofilicidade das superfícies, graças à introdução de grupos quinona-hidroquinona^{[36],[94],[108]}. A possível presença de microambientes hidrofílicos na matriz de suporte é apontada como um fator que favorece a estabilidade de biomoléculas imobilizadas uma vez que mimetiza a solvatação aquosa^[33]. Assim sendo, as medições dos ângulos de contacto indiciam um ambiente favorável à imobilização de lacase e à posterior construção de um eléctrodo aplicável a biossensores.

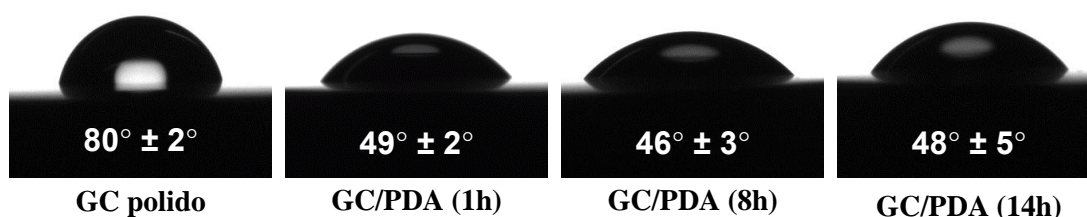


Figura 3.2: Ângulos de contacto e respetivos registos fotográficos de gotas de água sésseis (1 μ L) em superfícies de carbono vítreo polido e modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas. O desvio de padrão diz respeito à média do ângulo esquerdo e direito de 10 gotas idênticas ($n = 20$).

De modo a complementar as técnicas anteriores com informação morfológica, as superfícies foram analisadas por Microscopia de Força Atómica tal como descrito na secção 2.4.3. Apesar do carbono vítreo polido apresentar uma rugosidade considerável, foi possível observar variações na morfologia da superfície após revestimento com polidopamina (figura 3.3) e ainda estimar as espessuras dos filmes (figura 3.4). As superfícies analisadas apresentaram-se uniformes, com textura granular e

com a presença de riscos causados pelo polimento inicial. O tamanho de grão evolui de forma crescente com o aumento do tempo de polimerização, tendo inicialmente um diâmetro médio aproximado de 20 nm no GC que progride para 25, 30 e 40 nm nas superfícies GC/PDA. Tais diferenças subtis na textura da superfície e uma morfologia dominada pela superfície inicial do GC concordam com as medições dos ângulos de contacto, na medida em que não as influenciaram. Conclui-se por isso que a mudança de hidrofiliicidade da superfície de carbono para a superfície revestida deve-se apenas à alteração dos grupos químicos superficiais introduzidos pela polidopamina.

Para além da variação do diâmetro de grão, também a variação na rugosidade comprova a modificação da superfície a diferentes tempos de polimerização. Ao contrário do que é reportado na literatura sobre a deposição de polidopamina em ouro^[86], a tendência geral da rugosidade foi decrescente com o aumento do tempo de polimerização, o que indica uma forte influência da rugosidade inicial do substrato grafítico utilizado. Igualmente, esta diferença explica-se pelo baixo número de evento de deposição superficial de grandes partículas provenientes da solução. Levando a cabo a mesma modificação substituindo o GC por HOPG (carbono extremamente liso com terraços monoatômicos) replicaram-se os resultados da referência [86], obtendo a sequência de rugosidades 0,42, 0,89, 1,28 e 4,43 nm para HOPG limpo e modificado respetivamente. No entanto, a utilização do carbono vítreo teve o intuito de permitir correlacionar várias técnicas de caracterização superficial de modo a vislumbrar as propriedades da polidopamina. No que toca a ensaios elipsométricos, recorrer ao HOPG seria contraproducente devido à dispersão que provoca na luz incidente e ao facto de ser um material anisotrópico^{[66],[109]}. Utilizando um material macroscopicamente liso e isotrópico como o GC permite inclusive simular mais facilmente modelos óticos que contemplem a rugosidade da superfície.

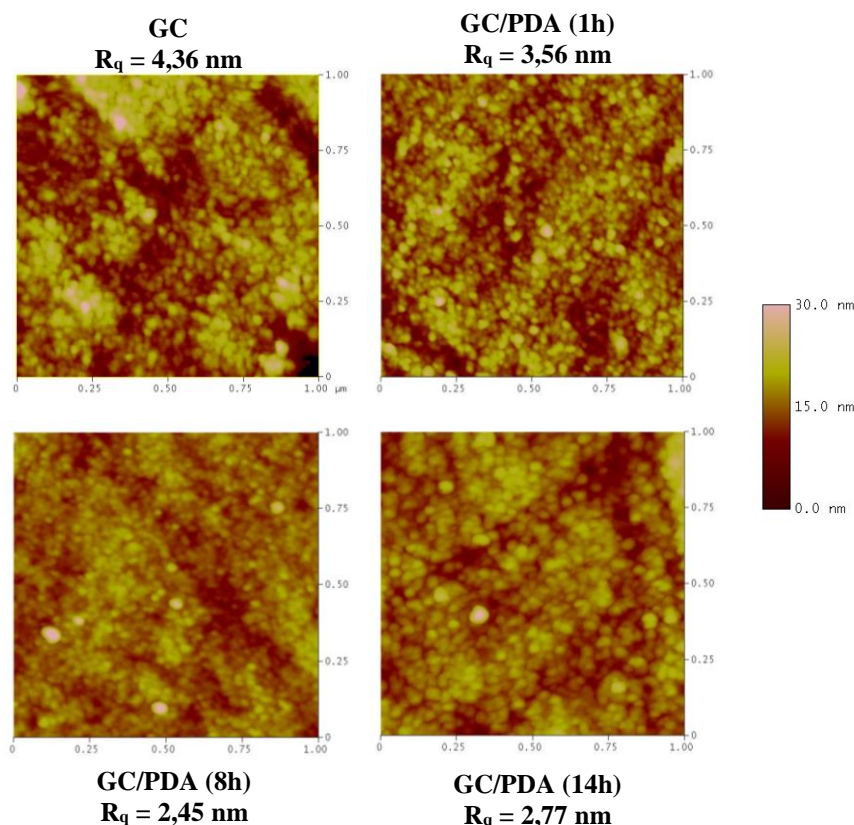


Figura 3.3: Imagens topográficas obtidas por AFM ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) e respetivas rugosidades (R_q) da superfície de carbono vítreo polido e modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas.

De modo a reforçar o significado real dos parâmetros elipsométricos estimados, avaliaram-se as espessuras pela obtenção de imagens morfológicas de riscos propositados. Ao passar a aresta de uma folha de papel sobre a superfície modificada, criam-se riscos que expõem o carbono vítreo anteriormente coberto pela polidopamina (figura 3.4). No caso da superfície GC/PDA(1h) não foi possível estimar com grande precisão a espessura do filme por este método, devido à forte influência da rugosidade no perfil de alturas desta superfície. Por outro lado, no caso dos filmes mais espessos (8 e 14 horas), estimaram-se espessuras muito próximas das espessuras óticas, pelo estabelecimento da profundidade média dos respectivos riscos. Graças à combinação da informação ótica, goniométrica e morfológica foi possível acompanhar o crescimento uniformemente distribuído de filmes de polidopamina sobre carbono vítreo, comprovando a possibilidade de controlar a sua espessura com o tempo de polimerização. De seguida o conhecimento sobre a química superficial destes filmes será aprofundada, através das caracterizações eletroquímicas.

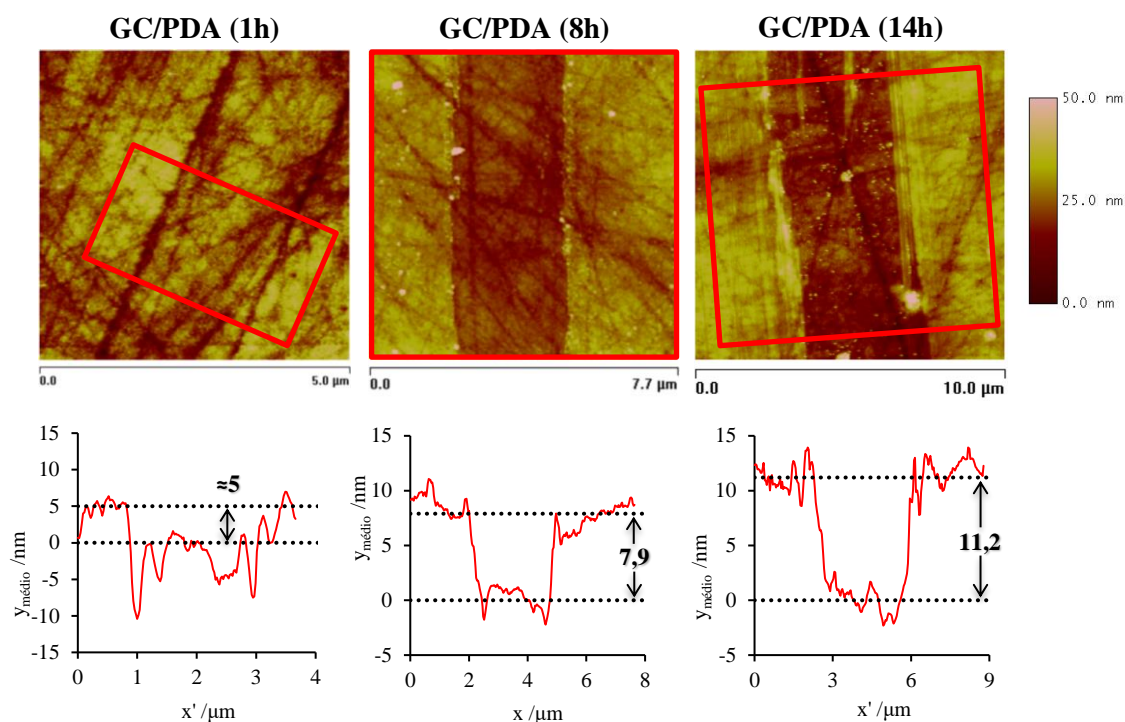


Figura 3.4: Imagens topográficas obtidas por AFM e respetivos perfis de altura média, de riscos propositados em carbono vítreo modificado com filmes de polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas. Os perfis de altura média correspondem às áreas assinaladas a vermelho.

3.1.2. Propriedades eletroquímicas

Na figura 3.5c, onde estão representados os voltamogramas referentes ao primeiro ciclo voltamétrico de cada elétrodo GC/PDA, observa-se um pico anódico predominante (*ca.* 0,4 V) que surge em todos os filmes e cuja intensidade aumenta com o aumento do tempo de polimerização, comprovando assim uma deposição sucessiva de material electroativo. Após determinar o potencial de pico associado à oxidação da dopamina em solução (DA; $E_p^a = 0,41$ V), no mesmo pH e velocidade de varrimento (figura 3.5a), foi possível confirmar que o pico anódico predominante dos elétrodos modificados deverá corresponder à oxidação de monómeros^[86] ou oligómeros^[87] aprisionadas nos filmes de polidopamina. A forma irreversível dos voltamogramas (figura 3.5c) sugere que as espécies oxidadas a quinonas

deverão difundir para a solução ou ser incorporadas no filme como material não eletroativo, explicando assim a baixa corrente catódica ao potencial de redução da dopaminoquinona (DAQ; $E_p^c = 0,17$ V – ver figura 3.5a).

Um pico anódico menos intenso (*ca.* 0,1V) foi observado no primeiro ciclo de cada GC/PDA (figura 3.5c). Apesar deste pico ser reportado em alguns estudos envolvendo dopamina^{[86],[110],[111]}, não foi possível a sua identificação inequívoca. Por outro lado, estudos sobre a oxidação da 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA)^[112], comportamento eletroquímico da adrenalina^[113] e eletropolimerização do indole-5,6-diol (DHI)^[114] reportaram um pico anódico irreversível atribuído à oxidação das respectivas formas DHI. Por semelhança com a dopamina, suspeita-se que o pico observado corresponda à oxidação de DHI, já que se trata de uma molécula intermediária da polimerização da dopamina^{[40],[42]}. Nos ciclos seguintes (figura 3.5d), o pico anódico diminui de intensidade tornando-se num ombro pouco distinto do pico anódico predominante. Possivelmente as moléculas ou oligômeros de DHI remanescentes do processo de polimerização, são oxidadas no primeiro varrimento anódico sendo incorporadas no filme de polidopamina.

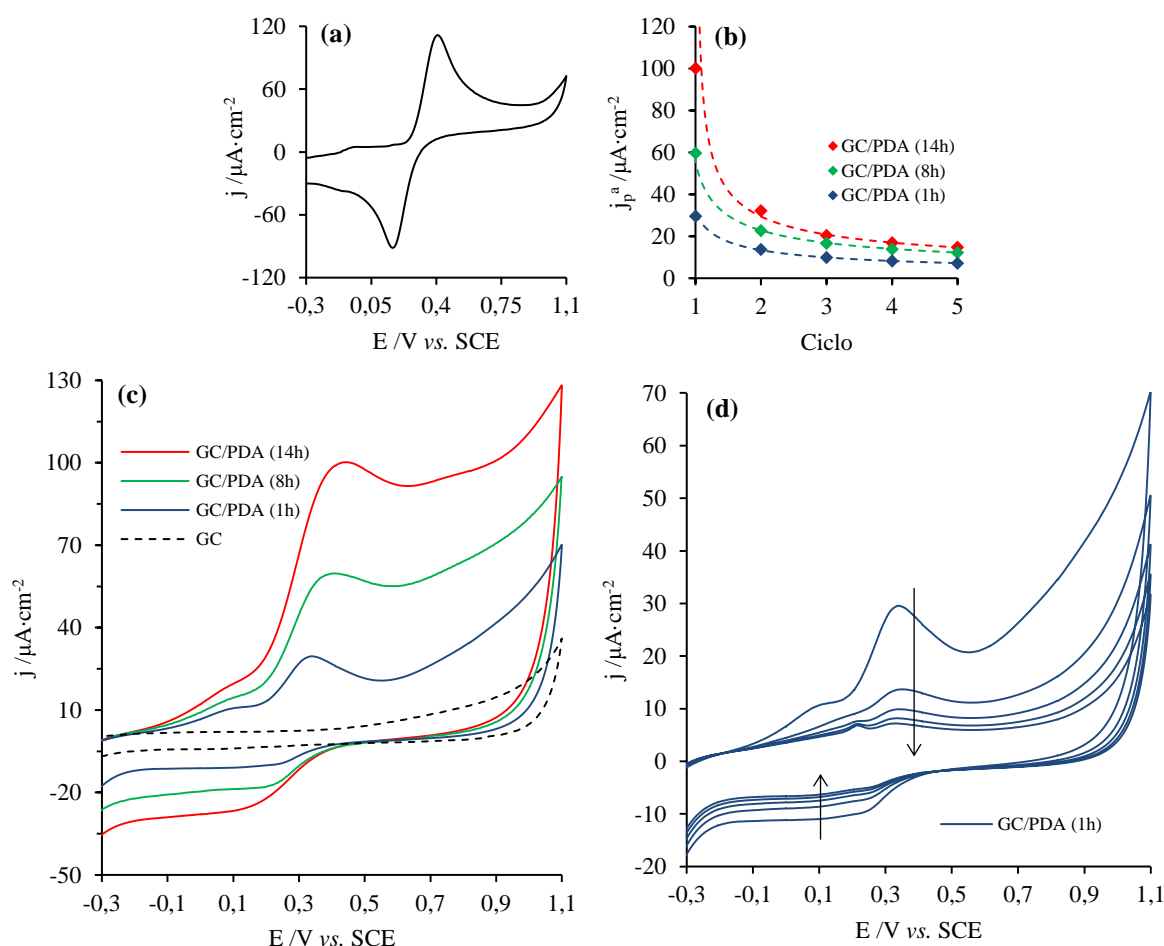


Figura 3.5: Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono vítreo ($A = 0,47$ cm²) em solução de dopamina a 0,5 mM (a); Decaimentos da densidade de corrente do pico anódico (j_p^a) predominante do eletrodo modificado com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas, em ciclos voltamétricos sucessivos (b). Primeiro ciclo voltamétrico do mesmo eletrodo limpo (linha tracejada) e modificado com filmes de polidopamina crescidos durante 1, 8 e 14 horas (linhas coloridas) (c); Primeiros cinco ciclos voltamétricos do eletrodo modificado com um filme de polidopamina crescido durante 1 hora (d) – setas indicam o sentido da variação de corrente ao longo dos varrimentos; Todos os voltamogramas foram registrados a 50 mV/s em tampão arejado citrato-fosfato com pH 4,6.

Nos ciclos seguintes de varrimento de potencial (figura 3.5d), observou-se um decréscimo acentuado do principal pico anódico, passando de uma situação de irreversibilidade dominante, no 1º ciclo, para uma situação mais reversível no 5º ciclo. Este comportamento, observado igualmente em filmes com 8 e 14 horas (figura 3.5b), sugere que todas as hidroquinonas aprisionadas nos filmes são oxidadas em poucos ciclos, tornando visível a conversão redox reversível dos grupos presentes na polidopamina. Notou-se também que tanto a polimerização de curta duração (1h) como a mais longa (14h) resultaram numa resposta eletroquímica comparável (figura 3.5b), concordando com o estabelecimento da espessura patamar referida nas caracterizações elipsométricas (secção 3.1.1). O uso de longos tempos de polimerização é por isso pouco vantajoso uma vez que resulta em pequenos aumentos de eletroatividade.

Por forma a confirmar a imobilização dos grupos quinona/hidroquinona (Q/HQ), os elétrodos modificados foram submetidos a vários varrimentos de potencial a diferentes velocidades como é o exemplo do elétrodo GC/PDA(8h) (figura 3.6a). Em todos os filmes de polidopamina observa-se um pico anódico e outro catódico a potenciais próximos dos potenciais redox associados à conversão DAQ/DA observada em solução (figura 3.5a). Os picos redox do filme de PDA são largos, o que pode ser explicado pela presença de grupos Q/HQ com diferentes vizinhanças químicas resultantes do processo de polimerização. Representando as correntes de pico de oxidação *versus* a velocidade de varrimento (figura 3.6b), confirmou-se a linearidade prevista pela equação 2.12, que descreve processos redox controlados por transferência de carga, provando-se assim a imobilização dos grupos Q/HQ presentes nos filmes de polidopamina. Utilizando a mesma equação e assumindo o envolvimento de 2 eletrões^{[115],[116],[117]}, estimou-se um recobrimento superficial destes grupos de $2,20 \times 10^{-11}$, $3,03 \times 10^{-11}$ e $3,86 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ para os filmes com 1, 8 e 14 horas respetivamente. Novamente se pode constatar que prolongamentos consideráveis na duração da polimerização resultam apenas num pequeno aumento de grupos eletroativos imobilizados. Apesar de uma maior quantidade de grupos quinona ser desejável para a posterior imobilização de lacase e nanopartículas, os resultados apresentados a seguir demonstram como polimerizações longas resultam em filmes de PDA incompatíveis com a criação de biossensores amperométricos, onde se pretenda medir um sinal eletroquímico consequente de uma reação enzimática.

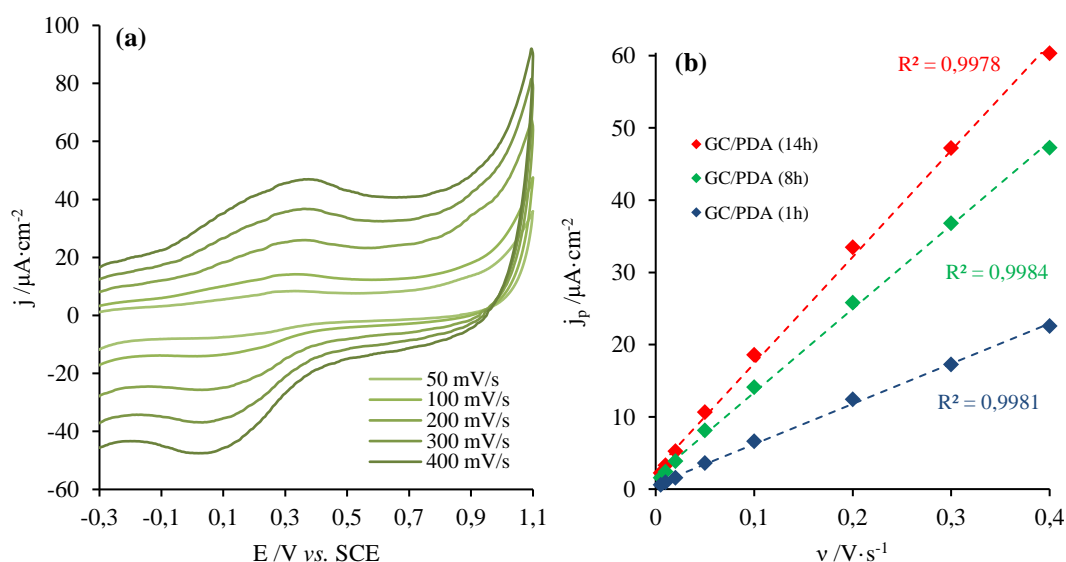


Figura 3.6: Voltamogramas cíclicos do elétrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina crescida durante 8 horas, registados a 50, 100, 200, 300 e 400 mV/s, em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6, após a estabilização eletroquímica ilustrada na figura 3.5b (a). Verificação da linearidade entre a densidade de corrente de pico média ($j_p = j_p^a/2 + |j_p^c|/2$) e a velocidade de varrimento (v) no intervalo de 5 a 400 mV/s dos elétrodos modificados com polidopamina crescida durante 1, 8 e 14 horas (b).

Uma vez conhecida a eletroatividade dos elétrodos GC/PDA, estudou-se a sua resposta eletroquímica dos elétrodos GC/PDA na presença de 1mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ ou ABTS (figura 3.7a e b), de modo a avaliar o eventual bloqueio destes filmes à conversão eletroquímica de produtos de reações enzimáticas. Comparando a intensidade e posição dos picos redox do elétrodo GC/PDA(1h) relativamente aos observados no elétrodo GC não modificados, constatarem-se sempre decréscimos de intensidade de corrente e ligeiros desvios de potencial, revelando um pequeno bloqueio da transferência eletrônica entre as espécies eletroativas e a superfície do GC. No caso do elétrodo GC/PDA(14h) o bloqueio foi total já que não se observam os picos redox. Como se poderá constatar mais adiante na caracterização elipsométrica, polimerizações mais longas originam filmes mais espessos e sendo a PDA um material semicondutor^[36] é espectável observar um bloqueio total a partir de uma determinada espessura. Filmes resultantes de polimerizações longas são por isso incompatíveis com a conceção de um biossensor, já que é necessária uma boa comunicação eletrônica entre a componente sensítiva (bioreceptor) e o transdutor. Assim sendo apenas elétrodos modificados com filme de 1 hora foram utilizados para os ensaios de imobilização de lacase e nanopartículas, uma vez que tais filmes apresentam recobrimentos superficiais significativos de grupos Q/HQ e ainda pouco bloqueio da transferência eletrônica entre espécies eletroativas e elétrodo.

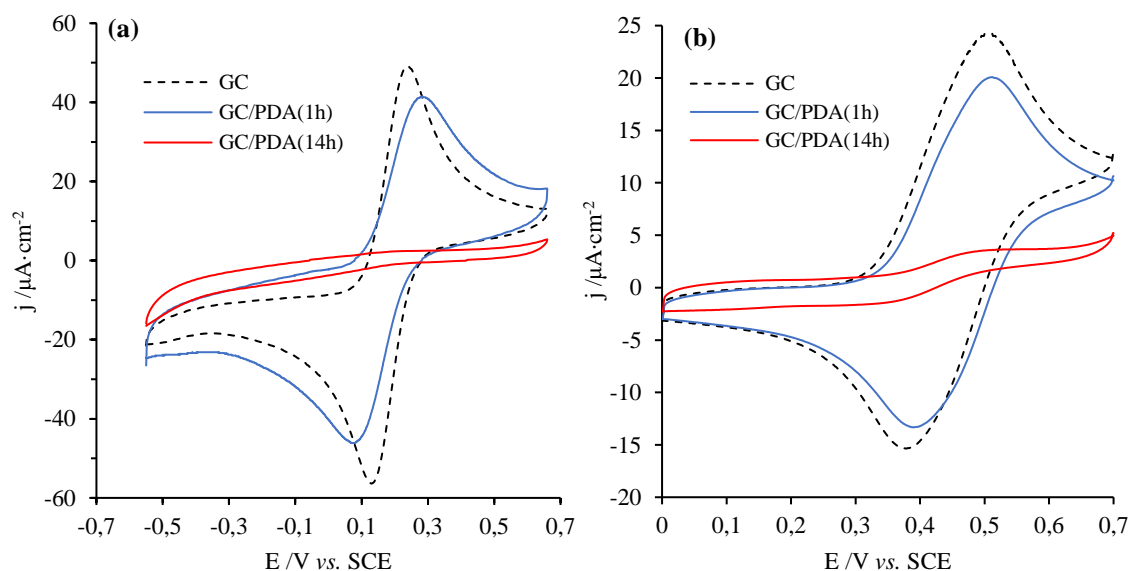


Figura 3.7: Voltamogramas cíclicos do elétrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) antes e após modificado com polidopamina crescida durante 1 e 14 horas, registados a 25 mV/s em tampão fosfato-salino de pH 7,4 desoxigenado com N_2 contendo 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (a) e registados a 5 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 4,6 desoxigenado com N_2 contendo 1 mM ABTS (b).

3.2. Crescimento Potenciodinâmico de Polidopamina

Para além da polimerização espontânea da dopamina em meio alcalino oxigenado, a polidopamina pode ser formada através da eletropolimerização da dopamina^{[51],[52],[54]}, ainda assim, esta segunda metodologia está pouco explorada. Apesar da polimerização espontânea ter as vantagens de não necessitar de equipamento especializado e cobrir virtualmente qualquer tipo de superfície^[36], existem também desvantagens no que toca à velocidade de polimerização e reprodutibilidade dos filmes. Por outro lado, a eletropolimerização tem o potencial de criar filmes mais reprodutíveis, de espessura e outras propriedades controláveis, tais como condutividade e eletroatividade^[56], utilizando soluções mais diluídas de monómero^[52]. Como principal desvantagem da eletropolimerização destaca-se a impossibilidade de crescer filmes sobre materiais não condutores, no entanto, tendo em mente a criação de um biossensor eletroquímico este facto torna-se irrelevante.

Procedeu-se a uma otimização da eletropolimerização da dopamina (10 mM) em CPB (pH = 7,0) variando a velocidade de varrimento (20, 50, 100 e 200 mV·s⁻¹). Ao se optar por um crescimento potenciodinâmico pretendeu-se obter informação preliminar sobre o processo de polimerização e observar o efeito da duração de eletrossíntese nas propriedades do filme. De modo a minimizar a oxidação química durante a eletrossíntese, o meio foi tamponado a pH neutro (CPB) e desoxigenado com azoto. Como se pode observar nas figura 3.8a a d, os crescimentos potenciodinâmicos consistiram em 3 ciclos de varrimento entre -0,6 e 0,8 V iniciando-se a -0,6 V. No primeiro varrimento anódico observou-se, em todos os crescimentos, o pico de oxidação da dopamina (DA) para a dopaminoquinona (DAQ). Notou-se que o potencial de oxidação da dopamina aumentou gradualmente com o aumento da velocidade de varrimento (0,45; 0,46; 0,55; 0,61 V). No início do varrimento catódico surge o pico de redução da DAQ gerada no varrimento anterior, cujo potencial de pico diminui com o aumento da velocidade de varrimento (0,05; 0,04; -0,01; -0,07 V) e cuja intensidade relativa à oxidação aumenta ($j_p^c/j_p^a = 0,01; 0,09; 0,21; 0,37$). A variação dos potenciais de pico deve-se ao comportamento *quasi-reversível* da conversão da dopamina^[117], enquanto que o aumento de corrente relativa é consequência da cinética de ciclização irreversível da DAQ para o leucodopaminocromo (LDAC)^{[118],[119]}. Por outras palavras, a velocidades baixas a redução da DAQ é quase impercetível porque o passo químico de ciclização ocorre durante mais tempo, consumindo quase toda a DAQ gerada no varrimento anterior. Sendo a LDAC uma espécie com maior facilidade em oxidar-se, ocorre então outro passo químico de oxidação da LDAC pela DAQ^{[113],[120]}, originando o dopaminocromo (DAC) – ver figura 3.9. Continuando o varrimento catódico surge o pico de redução do DAC (ca. -0,4 V) e no subsequente varrimento anódico o respetivo pico de oxidação (ca. -0,1 V). Para este processo de conversão quinona-hidroquinona (DAC/LDAC) foi observada a mesma dependência entre os potenciais de pico e a velocidade de varrimento, o que revela o seu comportamento *quasi-reversível*.

Comparando os potenciais de pico dos processos redox ao longo dos 3 ciclos, notou-se sempre o aumento dos potenciais anódicos e diminuição dos catódicos, o que deverá ser resultante do efeito bloqueador do filme de polidopamina em crescimento. Este efeito foi anteriormente discutido e observado em filmes espontâneos (secção 3.1.2). Relativamente à intensidade dos picos associados à conversão redox DAQ/DA, verificou-se o seu decréscimo ao longo dos ciclos, concordando com o efeito bloqueador. No caso da conversão redox DAC/LDAC, constatou-se um decréscimo dos picos associados apenas para velocidades mais baixas (20, 50 e 100 mV·s⁻¹). No crescimento realizado a 200 mV·s⁻¹, as intensidades destes picos aumentaram ligeiramente, contrariando o decréscimo de corrente devido ao efeito bloqueador do filme. Deduz-se que a velocidades de varrimento suficientemente altas, o fator dominante para a variação de corrente de pico é a acumulação superficial de DAC/LDAC ao longo da eletropolimerização.

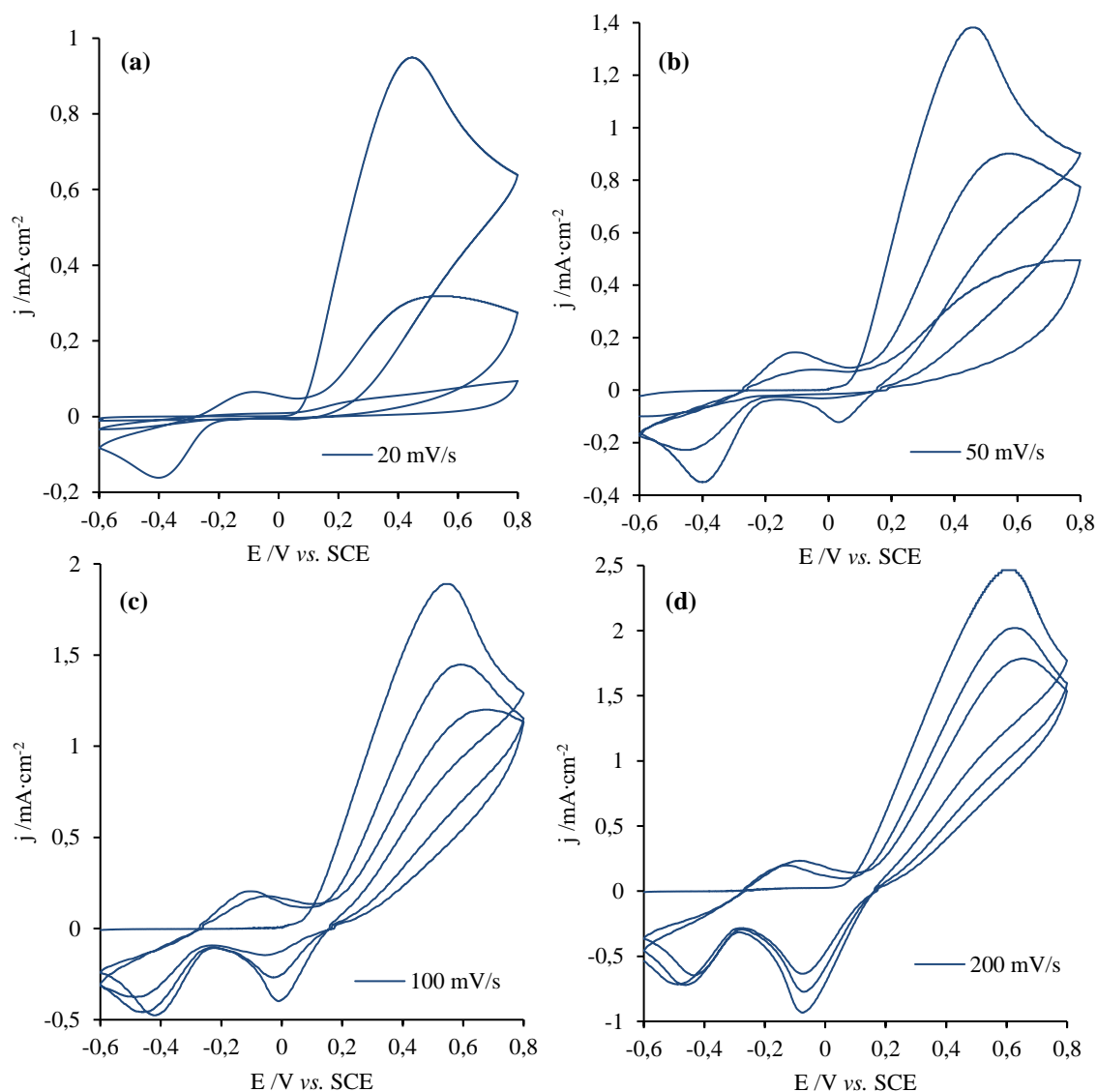


Figura 3.8: Crescimento potenciodinâmico de polidopamina sobre o eletrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) executado às velocidades de varrimento 20 (a), 50 (b), 100 (c) e 200 mV/s (d), durante 3 ciclos, em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 e contendo 10 mM dopamina.

Convém ainda referir que durante as eletropolimerizações não foram observados os picos redox associados à conversão indole-5,6-quinona/indole-5,6-diol (IQ/DHI) cujo o potencial formal é intermédio relativamente às outras duas conversões^{[111],[121]}. A concentração superficial de IQ/DHI enquanto monómero livre deverá ser muito inferior à concentração das restantes espécies. De facto, a primeira conversão DAQ/DA é a que apresenta picos de maior intensidade, seguida da conversão DAC/LDAC cuja concentração superficial dependerá da primeira conversão, e assim por diante até à terceira conversão (IQ/DHI). Note-se ainda que as correntes observadas para um eletrodo GC/ePDA encontram-se na ordem dos $50 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $400 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura 3.11), o que significa que qualquer corrente faradaica associada a espécies imobilizadas de IQ/DHI poderá estar completamente escondida.

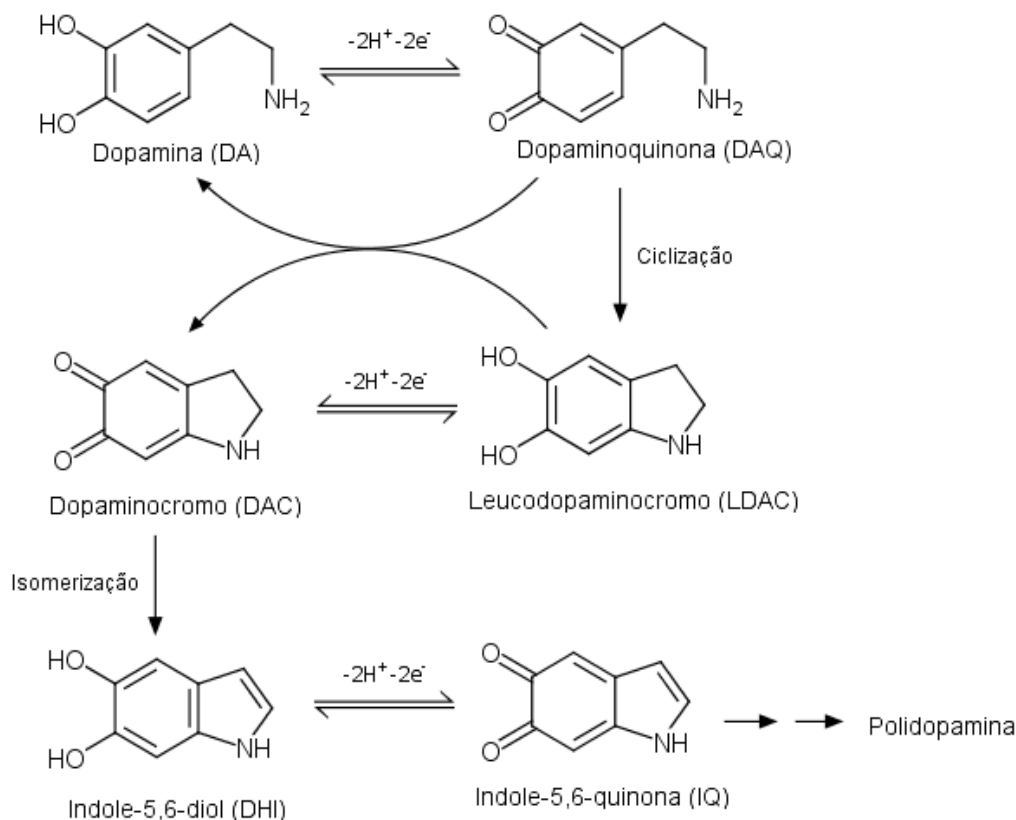


Figura 3.9: Etapas reacionais químicas e eletroquímicas da eletropolimerização da dopamina - adaptado de [51], [54], [116] e [121].

Após crescimento, os elétrodo GC/ePDA foram lavados com água, a solução eletrolítica foi alterada para CPB (pH = 7,0) sem dopamina dissolvida, e os filmes caracterizados por voltametria cíclica no intervalo de potenciais [-0,6; 0,8] V. Observou-se um pico anódico a 0,23 V no voltamograma do filme crescido a 20 mV·s⁻¹ e outro mais bem definido a 0,19 V para o caso do filme crescido a 200 mV·s⁻¹ (figura 3.10a e c), o qual pode ser atribuído à oxidação de dopamina a pH 7,0^{[52],[116]}. Tal como observado para filmes formados espontaneamente (secção 3.1.2), a intensidade do referido pico decresce rapidamente após cada ciclo (figura 3.10b e d), comportamento esse que foi descrito anteriormente para filmes espontâneos. No entanto note-se que o pH de caracterização dos dois casos não foi o mesmo: em meio ácido (CPB a pH = 4,6) onde foram caracterizados os filmes espontâneos, pode excluir-se a possibilidade de ter ocorrido uma eletropolimerização das espécies aprisionadas no filme^[52]; em meio neutro (CPB a pH=7,0) no qual se caracterizaram os filmes preparados eletroquimicamente, pode ter ocorrido a eletropolimerização das espécies aprisionadas e simultaneamente a difusão de parte das espécies. De qualquer modo a semelhança com o comportamento dos filmes espontâneos aponta para que a difusão e perda de espécies, seja o factor principal no decréscimo das densidades de corrente. Ensaio na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM) de ambos os tipos de filme a diferentes pH, poderiam elucidar sobre as perdas de massas nos primeiros varrimentos de potencial.

Para além do pico de oxidação da DA, observou-se ainda nos primeiros varrimentos cíclicos (figura 3.10a e c) um pico catódico menos intenso tanto no filme crescido lentamente (*ca.* -0,24 V) como no filme crescido rapidamente (*ca.* -0,14 V). Devido à largura dos picos não é possível atribuir estas correntes faradaicas à redução de um único tipo de quinonas, indicando mais uma vez a presença de diferentes tipos. A diferença de potencial observada pode ser explicada assumindo uma espessura ou menor porosidade para o filme crescido a 20 mV·s⁻¹. Visto que uma eletropolimerização a velocidade de varrimento baixa resulta em maior tempo de oxidação, maior quantidade de material polimérico

poderá ser depositado no elétrodo, resultando em maior espessura ou menor porosidade. Em ambos os casos, a detecção de picos redox é dificultada traduzindo-se em maiores diferenças nos potenciais de pico de um processo redox (ΔE_p). A mesma conclusão é retirada dos valores observados para os potenciais de oxidação da dopamina referidos anteriormente.

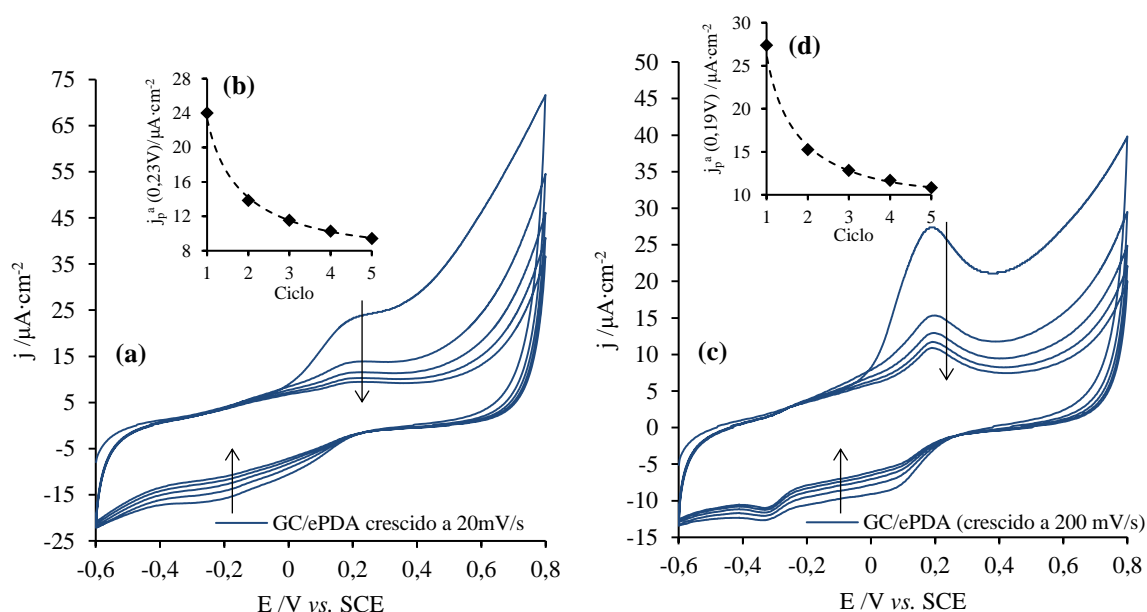


Figura 3.10: Primeiros voltamogramas cíclicos do elétrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada a 20 (a) e 200 mV/s (c), registados a 50 mV/s durante 5 ciclos em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 ; Respetivos decaimentos da densidade de corrente do pico anódico predominante (j_p^a) ao longo do varrimento de potencial - (b) e (d).

Foi ainda observado um ombro anódico pouco intenso e mal definido, tanto no filme crescido a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (*ca.* 0,05 V) como no filme crescido a $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (*ca.* 0,00 V). Este ombro de oxidação foi observado anteriormente nos primeiros voltamogramas de filmes formados espontaneamente, podendo ser atribuído à oxidação de resíduos de DHI. A baixa intensidade destes ombros, assim como das correntes catódicas observadas entre -0,4 e 0,1 V, revela que este tipo de espécies encontram-se principalmente na estrutura polimérica sob a forma de resíduos (moléculas covalentemente ligadas ao polímero), em vez de ficarem aprisionados no filme sob a forma de monómero livre. Contrariamente, a quantidade de monómeros de dopamina é superior a todas as outras espécies, corroborando com a eletropolimerização sequencial descrita na figura 3.9.

Após os primeiros 5 ciclos a $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, os elétrodos foram submetidos a varrimentos cíclicos com diferentes velocidades, tal como ilustram as figura 3.11a e c. Podem observar-se os processos redox já descritos com intensidades de pico anódicas e catódicas mais próximas de um sistema reversível. Ao confrontar as correntes dos picos redox com a velocidade de varrimento constatou-se uma relação linear (figura 3.11b e d), confirmando a imobilização destes grupos Q/HQ. Utilizando novamente a equação 2.12 e os declives das retas relativas à oxidação da dopamina, estimou-se um recobrimento superficial de $2,79 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ para o filme crescido a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e $3,25 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ para o filme crescido a $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. A menor eletroatividade do filme crescido a velocidade baixa revela o efeito bloqueador de um filme muito espesso ou compacto. Por outro lado um filme mais fino ou poroso permite observar claramente a oxidação da dopamina, o que significa que os grupos hidroquinona estão eletroquimicamente mais acessíveis. Conclui-se que as quantificações do recobrimento superficial utilizando a equação 2.12 são apenas indicativas do número total de Q/HQ, uma vez que as correntes de picos são fortemente afetadas pela espessura do filme. Importa referir que a síntese eletroquímica dos

filmes de polidopamina permitiu um crescimento muito mais rápido ($\leq 3,5$ min), obtendo-se recobrimentos superficiais comparáveis a um filme espontâneo de 8 horas.

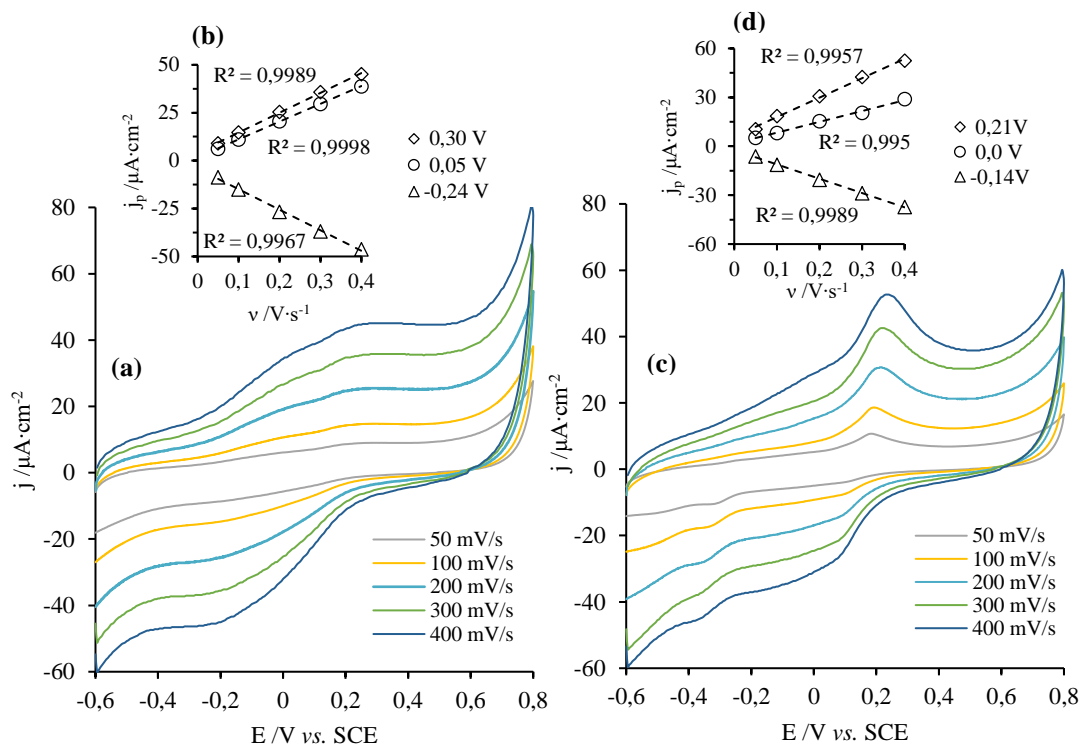


Figura 3.11: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada a 20 (a) e 200 mV/s (c), registados a 50, 100, 200, 300 e 400 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 ; Respetivas verificações da linearidade entre as densidades de corrente de pico (j_p) e a velocidade de varrimento (v) – (b) e (d).

Note-se que o pico catódico a -0,35 V observado apenas no filme crescido a $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ (figura 3.10c e figura 3.11c) trata-se da redução de oxigénio residual^[52], cujas intensidades de corrente aumentam linearmente com o aumento de $v^{1/2}$. Sendo um pico pouco intenso, o mesmo não se observou no filme crescido lentamente devido à sua espessura ou compacticidade maior.

Por forma a observar o comportamento de espécies eletroativas nos eletrodos GC/ePDA, foram registados voltamogramas dos mesmos na presença de 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (figura 3.12). Num eletrodo limpo de carbono vítreo pode observar-se o processo de conversão redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ com picos bem definidos e de comportamento reversível. Após modificação do carbono vítreo, as correntes faradaicas devidas às espécies $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ diminuem com a diminuição da velocidade de crescimento, ou seja, relacionam-se com a duração da eletropolimerização. Quanto maior o tempo de eletropolimerização presume-se que maior será a quantidade de material polimérico depositado sobre o eletrodo e consequentemente maior é o efeito bloqueador. Este efeito foi igualmente discutido anteriormente para filmes formados espontaneamente (secção 3.1.2). Novamente se conclui que uma eletropolimerização mais longa é prejudicial na transferência de carga de espécies próximas da superfície do eletrodo.

O filme crescido a $200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ foi o único onde se observaram os picos redox associados ao par $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, havendo um desvio positivo do pico anódico (+0,22 V) e um desvio negativo do pico catódico (-0,23 V) relativamente ao potencial formal (E^0), que refletem alguma dificuldade de oxidação e redução das espécies. Ainda assim, por apresentar o menor efeito bloqueador, o crescimento mais rápido foi escolhido para a criação dos biossensores de grafite apresentados mais adiante. Visto que a

dopamina polimeriza rapidamente, poder-se-ia controlar com maior eficácia eletropolimerizações curtas utilizando um crescimento potencioestático.

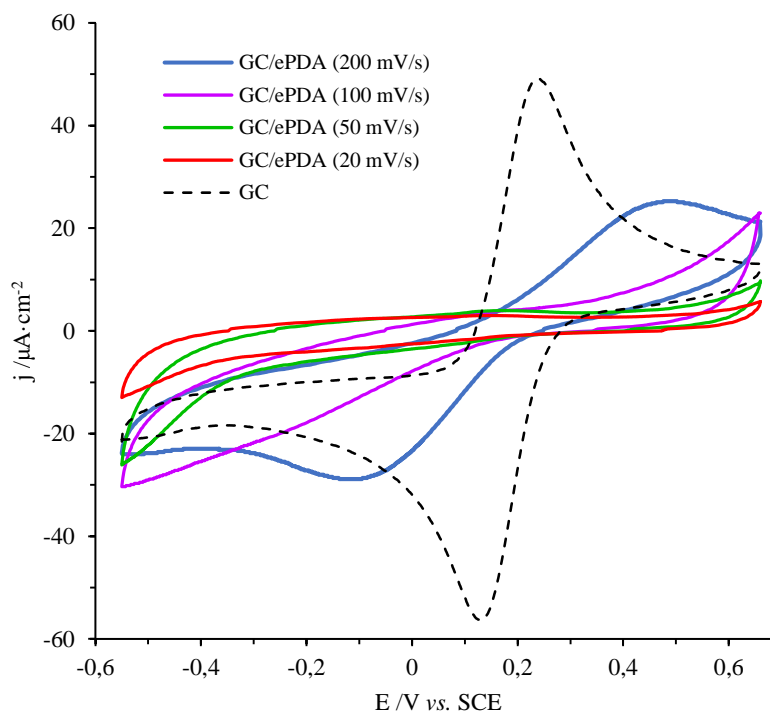


Figura 3.12: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) modificado com polidopamina eletrossintetizada com 3 ciclos de varrimento de potencial a 20, 50, 100 e 200 mV/s, registados a 25 mV/s em tampão fosfato-salino de pH 7,4 desoxigenado com N_2 e contendo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1 mM.

De um modo geral as caracterizações eletroquímicas de filmes químicos e eletrossintetizados de PDA revelaram uma grande variedade de resíduos Q/HQ eletroativos cujo recobrimento superficial depende do tempo de polimerização. Não foram encontradas evidências para afirmar que os dois tipos de filmes apresentam composições diferentes. Uma caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e/ou por espectroscopia de fotoelectrões de raios-X (XPS) poderia talvez fornecer informação mais precisa sobre a identidade das espécies. No entanto, a eletropolimerização apresenta assim uma grande potencialidade para a modificação de superfícies condutoras, contendo propriedades eletroquímicas muito semelhantes aos filmes formados espontaneamente. Confirmou-se também a presença de resíduos de dopamina na PDA eletrossintetizada, facto importante para a posterior imobilização de biomoléculas, visto que as propriedades biomiméticas da PDA são atribuídas não só aos grupos Q/HQ mas também à amina primária da dopamina.

Capítulo 4

Biossensores de carbono baseados em
PDA e Lacase

4. Biossensores de carbono baseados em PDA e Lacase

4.1. Atividade Catalítica da Lacase

Devido à sua versatilidade tecnológica^{[2], [20]} e à sua atividade catalítica para a oxidação de diversos substratos fenólicos e amina aromáticas^[22], a lacase foi o enzima selecionado para efetuar o reconhecimento biológico nos biossensores desenvolvidos. Um substrato não-fenólico muito utilizado para caracterizar a sua atividade é o ABTS, tanto em ensaios espectrofotométricos como eletroquímicos. De modo a averiguar a catálise promovida pelo preparado de lacase fornecido (370,6 U/mL), o mesmo foi diluído (1:100) em CPB (pH = 4,6) visto ser um pH adequado à oxidação catalítica do ABTS^[22]. De seguida vários voltamogramas cíclicos foram registados após cada adição de ABTS (figura 4.1a), mantendo o meio eletrolítico oxigenado através do arejamento entre registos. Observou-se o aparecimento de ondas catódicas de forma sigmoideal cujas intensidades aumentaram com o aumento da concentração de ABTS. Tal comportamento é característico de uma oxidação catalisada por enzima^{[99], [122], [123]}. Na ausência de lacase, o sinal eletroquímico do ABTS apresenta dois picos redox bem definidos (figura 4.1c) que resultam do estabelecimento de um gradiente de concentração entre a superfície do eletrodo e a solução, ou seja, um voltamograma típico duma conversão redox não catalisada. Na presença de lacase, o ABTS é oxidado a radical catião (ABTS^{•+}) pelo centro catalítico de cobre T1^[124] (figura 4.1b), que por sua vez é reduzido e detetado na superfície do GC. Como consequência da catálise enzimática, não se observa o pico de oxidação do ABTS ($E_p^a = 0,52$ V) e ocorre o estabelecimento de uma corrente patamar catódica a potenciais inferiores ao E_p^c do ABTS^{•+} (0,40 V). Note-se que a presença de oxigénio é essencial para regenerar o enzima através da oxidação do centro catalítico trinuclear, composto por um átomo de cobre T2 e dois T3^[23].

Ao esboçar um gráfico da densidade de corrente catalítica ($j-j_b$) *versus* a concentração de ABTS obteve-se de uma curva do tipo Michaelis-Menten (figura 4.1d) que foi ajustada utilizando as ferramentas de regressão não-linear do software *OriginPro* 9.0 pertencente a *OriginLab*. O uso de um método dos mínimos quadrados não-linear permite obter coeficientes de determinação (R^2) mais elevados e prevenir a heterocedasticidade dos resíduos, sendo preferível ao uso das tradicionais linearizações da equação de Michaelis-Menten^{[125], [126]}. Tendo em conta a proporcionalidade direta entre a densidade de corrente catalítica e a velocidade de oxidação ($j \propto v$)^[82], utilizou-se a seguinte equação de Michaelis-Menten adaptada^{[29], [127]}:

$$j = \frac{j_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Onde:

- j , é a densidade de corrente catalítica em $\mu A \cdot cm^{-2}$;
- j_{max} , é a densidade de corrente máxima em $\mu A \cdot cm^{-2}$;
- $[S]$, é a concentração do substrato S, em μM ;
- K_M , é a constante de Michaelis-Menten aparente do substrato S, em μM .

Relativamente aos parâmetros cinéticos ajustados, é possível afirmar que a constante de Michaelis-Menten (18,5 μM) se encontra no intervalo de valores reportado para lacases fúngicas (4 – 770 μM)^{[22], [124], [128]}, estando inclusive abaixo da média^[22]. Apesar de um valor baixo ser indicativo de boa afinidade entre enzima e substrato, a corrente máxima correspondente ao estado de saturação do enzima ($j_{max} = 1,14 \mu A \cdot cm^{-2}$) é baixa comparativamente com ensaios realizados a lacases purificadas^{[28], [129]}, o que poderá ser apenas uma consequência da baixa concentração de lacase no eletrólito, já que o modelo de Michaelis-Menten assume uma proporcionalidade direta entre v_{max} e concentração total de enzima^[130].

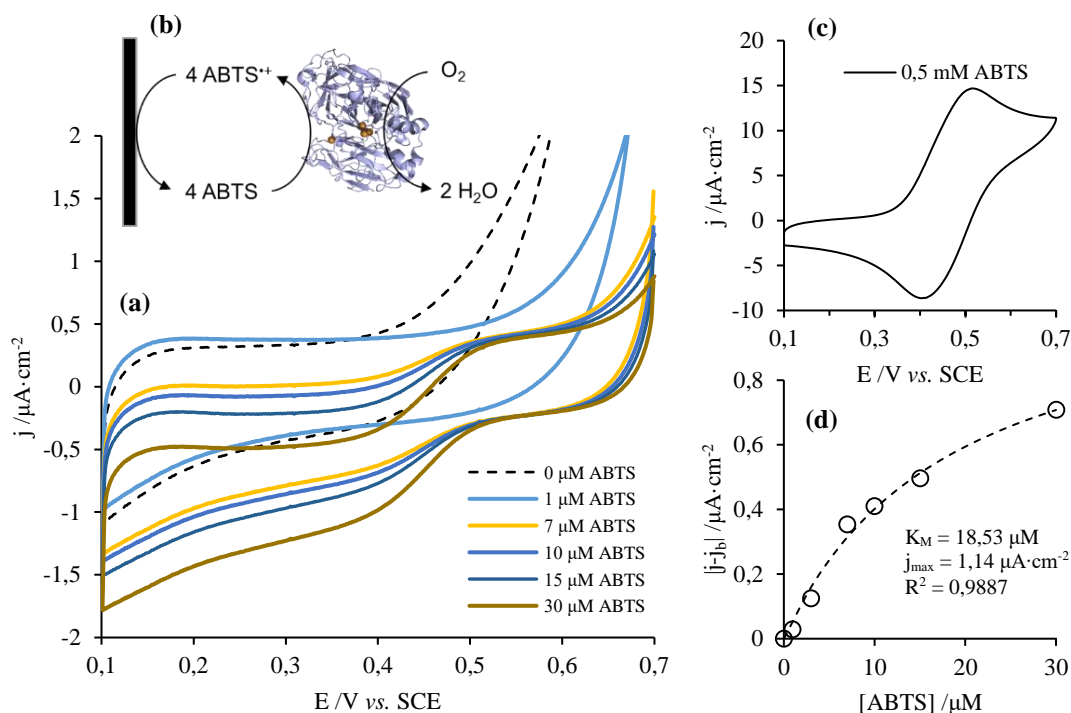


Figura 4.1: Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono vítreo ($A = 0,47 \text{ cm}^2$) registados a 5 mV/s em solução de lacase diluída 1:100 em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo 0, 1, 7, 10, 15 e 30 μM ABTS (a); Esquema da oxidação enzimática do ABTS pela lacase na presença de oxigénio e regeneração eletroquímica do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pelo eletrodo (b); Voltamograma cíclico do mesmo eletrodo em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo 0,5 mM de ABTS registado a 5 mV/s (c); Curva Michaelis-Menten obtida a partir das correntes catalíticas ($j - j_b$) dos voltamogramas do gráfico (a), medidas a 0,4 V (d).

Concluindo, o ensaio voltamétrico da atividade enzimática do preparado de lacase revelou uma ótima afinidade da lacase presente para a oxidação do ABTS, sustentando a utilização deste mediador redox na caracterização de biossensores baseados em lacase. Como parâmetro cinético importante destaca-se o K_M que poderá ser diretamente comparado o K_M da lacase imobilizada^[130], independentemente das quantidades envolvidas em cada caso.

4.2. Caracterização dos eletrodos de Grafite/PDA/Lac

Por forma a averiguar a capacidade de imobilização dos filmes espontâneos de polidopamina, foram incubados eletrodos de grafite/PDA no preparado de lacase utilizando as condições descritas para o método A sem qualquer adição de nanopartículas. Utilizando uma preparação em dois passos é possível garantir que a lacase não é imobilizada através de um processo físico de aprisionamento ou encapsulamento, testando apenas a química superficial do filme. Para além disso a abundante lavagem que é realizada após incubação, tem como objetivo remover lacases fracamente ligadas ao filme, ao mesmo tempo que coloca à prova a estabilidade das interações químicas formadas.

Os eletrodos de grafite/PDA/Lac foram repetidamente caracterizados por voltametria cíclica e cronoamperometria com adições sucessivas de ABTS ao eletrólito arejado de CPB (pH = 4,6), permitindo comparabilidade com as restantes caracterizações. Como se pode observar nos voltamogramas do primeiro dia de utilização (figura 4.2a), à medida que é adicionado ABTS ao eletrólito ocorre o desenvolvimento de correntes catódicas catalíticas cada vez mais intensas. Mais uma

vez a ocorrência de catálise enzimática é comprovada pela forma sigmoidal dos voltamogramas e pela inexistência do pico de oxidação do substrato a 0,5 V. Note-se ainda que no primeiro voltamograma (0 μM ABTS) observam-se os picos de corrente associados ao processo redox Q/HQ ($E_{1/2} = 0,3$ V), e que apresentam uma intensidade decrescente ao longo da experiência. Trata-se do mesmo comportamento eletroquímico observado nos elétrodos GC/PDA caracterizados anteriormente.

Ao registar alternadamente com a voltametria cíclica, um cronoamperograma de pulso único após cada adição, foi igualmente possível seguir o aumento da concentração superficial da espécie ABTS^{++} resultante da oxidação enzimática (figura 4.2b). Ao esboçar a corrente catalítica ($|j-j_b|$) medida aos 200 segundos em função da concentração de ABTS (figura 4.2c), constatou-se que a grafite modificada apresenta uma curva de resposta prevista pela cinética de Michaelis-Menten e cujos parâmetros ajustados se encontram na tabela 4.1. Pelo tipo de curva ajustada e pela intensidade das correntes registadas é novamente confirmada a imobilização da lacase no elétrodo modificado.

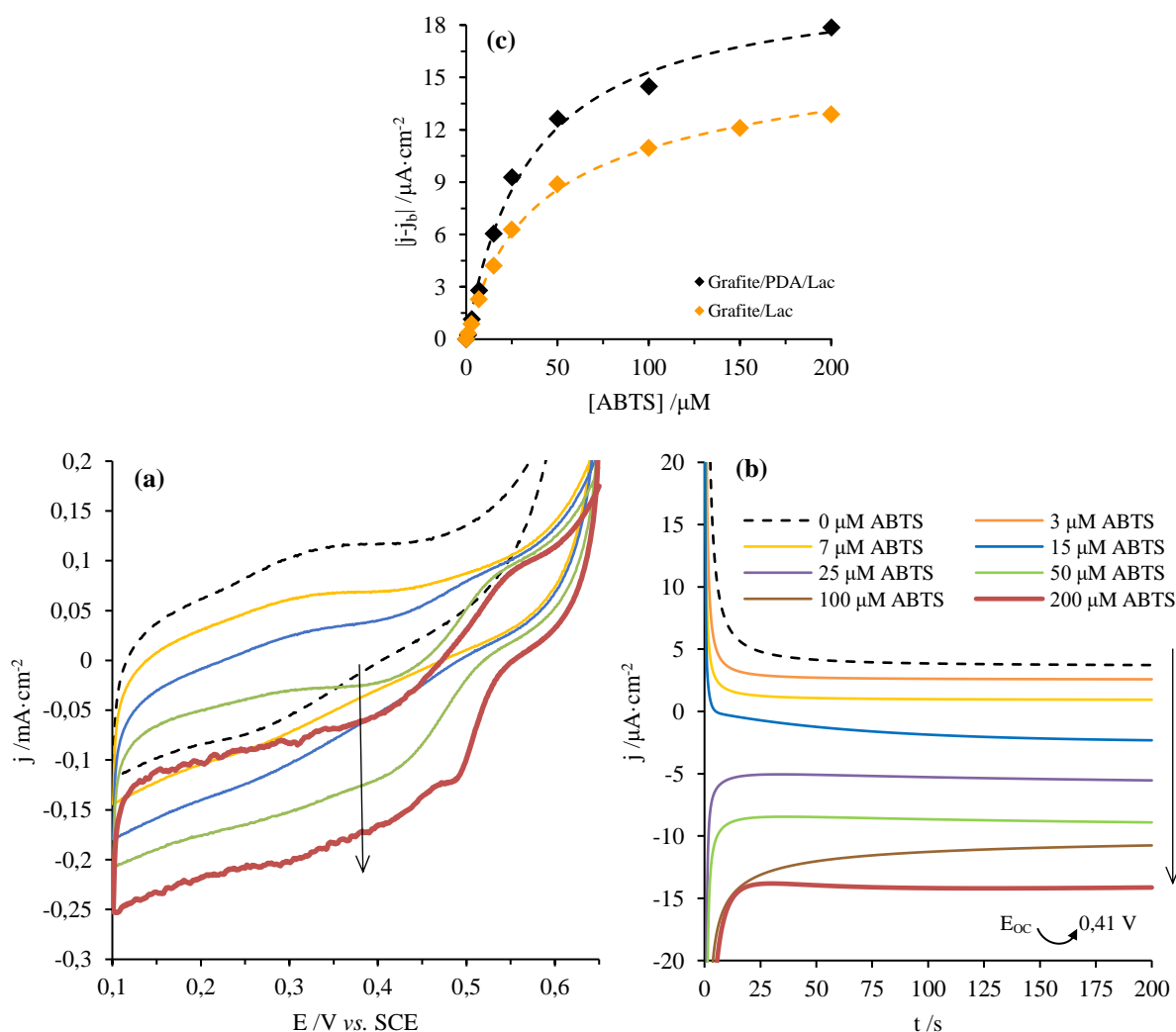


Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos do elétrodo grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registado a 2 mV/s (a) e cronoamperogramas resultantes do pulso simples $E_{\text{oc}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ (b), em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100 e $200 \mu\text{M}$ – as setas indicam o sentido da evolução da corrente com o aumento de concentração de substrato; Curvas Michaelis-Menten obtidas a partir das correntes catalíticas amperométricas ($j-j_b$) dos elétrodos grafite/Lac e grafite/PDA/Lac (c).

Idealmente a lacase imobilizada apresenta parâmetros cinéticos semelhantes ou melhores do que o enzima livre, no entanto tal como é reportado frequentemente^[20] a lacase imobilizada pode apresentar uma menor afinidade para o substrato caracterizada por valores maiores de K_M . De forma idêntica, a lacase imobilizada no filme espontâneo de polidopamina ($K_M = 35,5 \mu\text{M}$) e adsorvida em grafite ($K_M = 37,7 \mu\text{M}$) apresentaram constantes K_M maiores do que a constante obtida para o enzima livre ($K_M = 18,5 \mu\text{M}$), o que poderá dever-se a alguma alteração conformacional ou dificuldade dos substratos em difundir até aos centros catalíticos^[20]. Importa realçar que a polidopamina aparenta ser um ambiente mais adequado para a imobilização de lacase do que uma superfície de grafite, considerando apenas as constantes de Michaelis-Menten para cada caso. Como se constará mais adiante é possível diminuir esta constante cinética utilizando filmes eletrossintetizado (secção 4.3), o que significa que os resultados da figura 4.2 poderão possivelmente ser otimizados no que toca às condições de polimerização e de imobilização.

Relativamente às correntes de saturação (j_{max}) da figura 4.2c, destaca-se o eletrodo modificado de grafite/PDA/Lac por apresentar o maior valor ($20,7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) do que o eletrodo sem PDA ($15,2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Este resultado indica que o uso de polidopamina permitiu aumentar a quantidade de lacase imobilizada e ativa no eletrodo comparativamente ao uso de uma superfície limpa de grafite. Para chegar a tal conclusão, assume-se que a constante de velocidade de formação do ABTS^{++} (k_{cat}) deverá ser idêntica quando o enzima está imobilizado em PDA ou diretamente em grafite. A mesma aproximação não deve ser considerada entre o enzima livre e imobilizado, o que torna a catálise em solução incomparável com as restantes. No entanto, as correntes catalíticas do eletrodo grafite/PDA/Lac foram substancialmente superiores às correntes catalíticas originadas pela enzima em solução ($j_{\text{max}} = 1,1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$; figura 4.1d) ainda que quantidades de preparado de lacase utilizadas em ambos os casos tenham sido idênticas. Esta diferença demonstra o efeito de concentração superficial que se pode conseguir ao imobilizar a lacase no eletrodo. Para além disso, suspeita-se que mesmo após 3 horas de incubação grande parte da lacase não ficou imobilizada no filme de polidopamina, o que significa que a mesma quantidade de preparado poderia servir para modificar vários eletrodos, reduzindo significativamente o custo de preparação.

Após o ensaio do primeiro dia, o eletrodo foi lavado com água e guardado no frigorífico para que posteriores ensaios pudessem ser realizados. Nas figura 4.3a e b estão apresentados os cronoamperogramas da resposta do mesmo eletrodo no segundo e quinto dia após preparação. Ao contrário dos sucessivos ensaios cronoamperométricos para cada concentração de ABTS, apresentados na figura 4.2b, a adição de ABTS decorreu durante a aplicação de potencial resultando num gráfico com múltiplos patamares de corrente. Pode observar-se que o aumento da concentração de ABTS continua a originar correntes catalíticas acentuadas mesmo após múltiplas utilizações do eletrodo, o que confirma uma imobilização bem-sucedida da lacase.

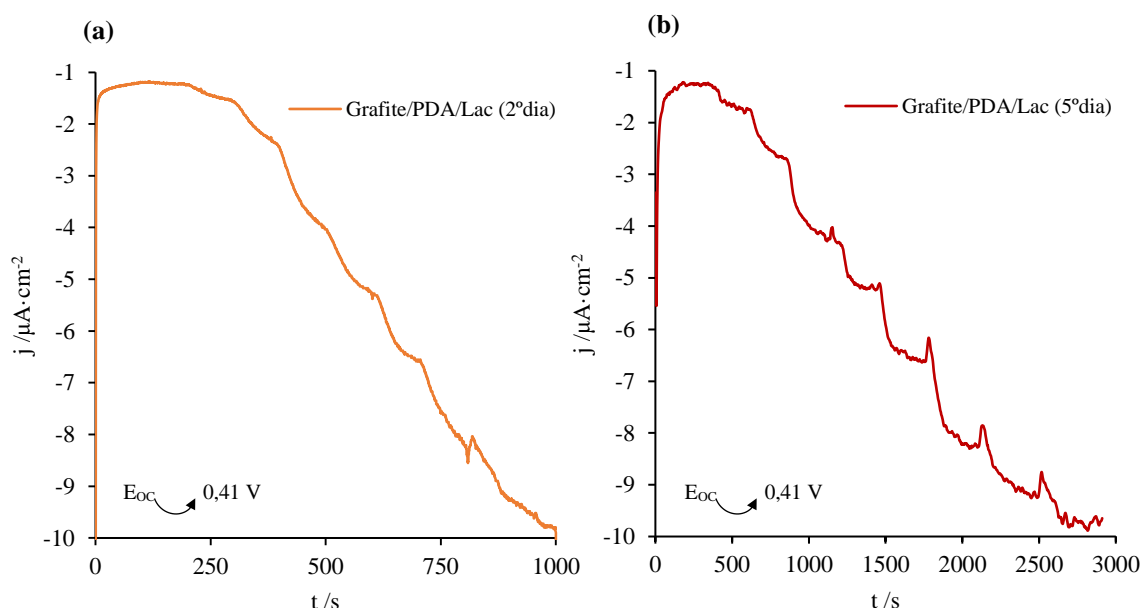


Figura 4.3: Respostas cronoamperométricas do eletrodo grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no segundo (a) e quinto (b) dia de utilização, obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM .

Associando a corrente de cada patamar a uma concentração de ABTS, foi possível esboçar as curvas de resposta que novamente seguem um formato hiperbólico previsto pela cinética de Michaelis-Menten (figura 4.4). Nas primeiras 24 horas ocorreu uma perda significativa de atividade que se caracteriza pela diminuição de 53% da corrente de saturação e de 55% da sensibilidade na região linear. Em contraste o valor de K_M apenas aumentou 9%, o que reflete a conservação da afinidade enzima-substrato apesar da perda quantitativa de enzima ativa. O crescimento de um filme posterior de polidopamina talvez pudesse prevenir uma queda tão abrupta de atividade. Após o decréscimo de atividade, o eletrodo modificado manteve uma resposta estável por mais 4 dias como se pode constatar pela semelhança entre as curvas relativas ao segundo e quinto dias. Também pela comparação dos parâmetros cinéticos da tabela 4.1 se observa uma resposta relativamente estável do segundo para o quinto dia de utilização, facilmente perceptível pelas razões j_{\max}/K_M . A estabilização da atividade enzimática foi de facto devida ao ambiente biomimético da polidopamina, já que a lacase adsorvida diretamente na superfície gráfica apresentou um K_M muito mais elevado no segundo dia (130 μM).

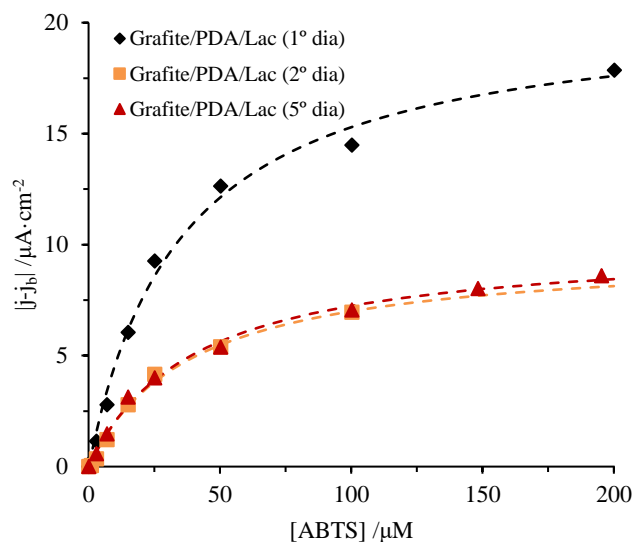


Figura 4.4: Curvas Michaelis-Menten do eletrodo modificado grafite/PDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.

Tendo em vista o grande potencial de aplicação destes eletrodos modificados na área dos biossensores, foram estabelecidos os intervalos de resposta linear e determinadas as sensibilidades para a detecção de ABTS (tabela 4.1). Comparativamente com a literatura, obtiveram-se intervalos de resposta linear típicos para a detecção de ABTS com sensibilidades elevadas tendo em conta a simplicidade da metodologia utilizada^{[29],[69],[131],[132]}. Mais adiante serão exploradas outras metodologias de imobilização por forma a melhorar a sensibilidade.

Tabela 4.1: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados às respostas amperométricas do eletrodo modificado grafite/PDA/Lac no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.

Dia	Ajuste Michaelis-Menten				Ajuste linear		
	$K_M / \mu\text{M}$	$j_{\text{max}} / \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$	$j_{\text{max}} \cdot K_M^{-1} / \text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	R^2	Intervalo $/ \mu\text{M}$	Sensibilidade $/ \text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$	R^2
1º	35,5	20,7	583	0,9929	1 - 25	378	0,9971
2º	38,8	9,7	250	0,9912	1 - 25	170	0,9931
5º	40,0	10,1	253	0,9960	1 - 15	207	0,9995

4.3. Grafite/PDA/Lac versus Grafite/ePDA/Lac

Uma vez testada a aptidão da polidopamina espontânea para a imobilização de lacase, prosseguiu-se com a caracterização de uma grafite modificada com polidopamina eletrossintetizada e lacase (Grafite/ePDA/Lac). Novamente recorreu-se a uma modificação de dois passos (método A da secção 2.3.3.1) por forma garantir que a lacase não fique imobilizada por processos físicos de aprisionamento ou encapsulamento.

Como se pode observar na figura 4.5a, o filme de polidopamina foi crescido potenciodinamicamente nas condições já previamente otimizadas (200 mV/s), sobre um eletrodo de grafite limpo. Comparativamente com o crescimento em carbono vítreo observou-se que os picos redox

associados ao par Q/QH e DAC/LDAC sofreram desvios de potencial que indicam uma maior dificuldade em oxidar e reduzir espécies na superfície da grafite. Pelo mesmo motivo não é observado o pico de oxidação da dopamina que se esperaria ocorrer a 0,61 V. No entanto a intensa corrente anódica entre 0,2 e 0,8 V comprova a oxidação da dopamina na superfície do eletrodo. No decorrer dos três varrimentos de potencial foi observado o decréscimo de intensidade dos picos redox, assim como da corrente de oxidação a 0,8 V. Este comportamento foi discutido anteriormente (secção 3.2) e reflete a deposição do filme de polidopamina sobre o eletrodo. Após a eletrossíntese o eletrodo foi lavado e posto em contacto com o preparado de lacase por 3 horas. Como se pode constatar nos voltamogramas da figura 4.5b, a corrente capacitiva é maior no eletrodo grafite/ePDA/Lac do que no mesmo eletrodo antes da modificação, podendo assim comprovar-se a alteração da superfície do eletrodo devido à deposição de um filme pouco condutor.

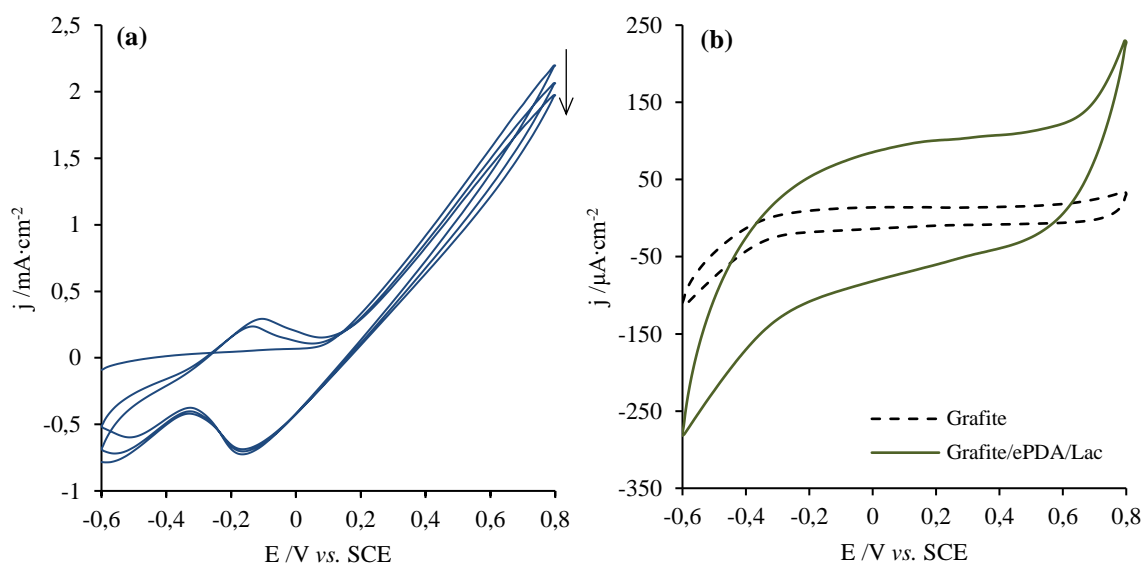


Figura 4.5: Crescimento potenciodinâmico de polidopamina sobre grafite ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) em tampão citrato-fosfato de pH 7,0 desoxigenado com N_2 e contendo dopamina a 10 mM (a); Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite e grafite/ePDA/Lac registados a 50 mV/s em tampão citrato-fosfato de pH 4,6 desoxigenado com N_2 (b).

Realizando um ensaio cronoamperométrico ao potencial de redução do substrato ABTS, foi possível averiguar o desempenho catalítico do eletrodo grafite/ePDA/Lac no primeiro e segundo dia de utilização. Pode constatar-se o desenvolvimento de patamares catódicos com intensidades progressivamente mais negativas como resultado da adição de ABTS (figura 4.6a). Tal como referido nos ensaios anteriores, a intensificação das correntes catódicas ocorre devido ao aumento da concentração superficial de substrato oxidado enzimaticamente (ABTS^{*+}). A imobilização bem-sucedida da lacase num filme eletrossintetizado corrobora a importância dos grupos quinona na imobilização da lacase.

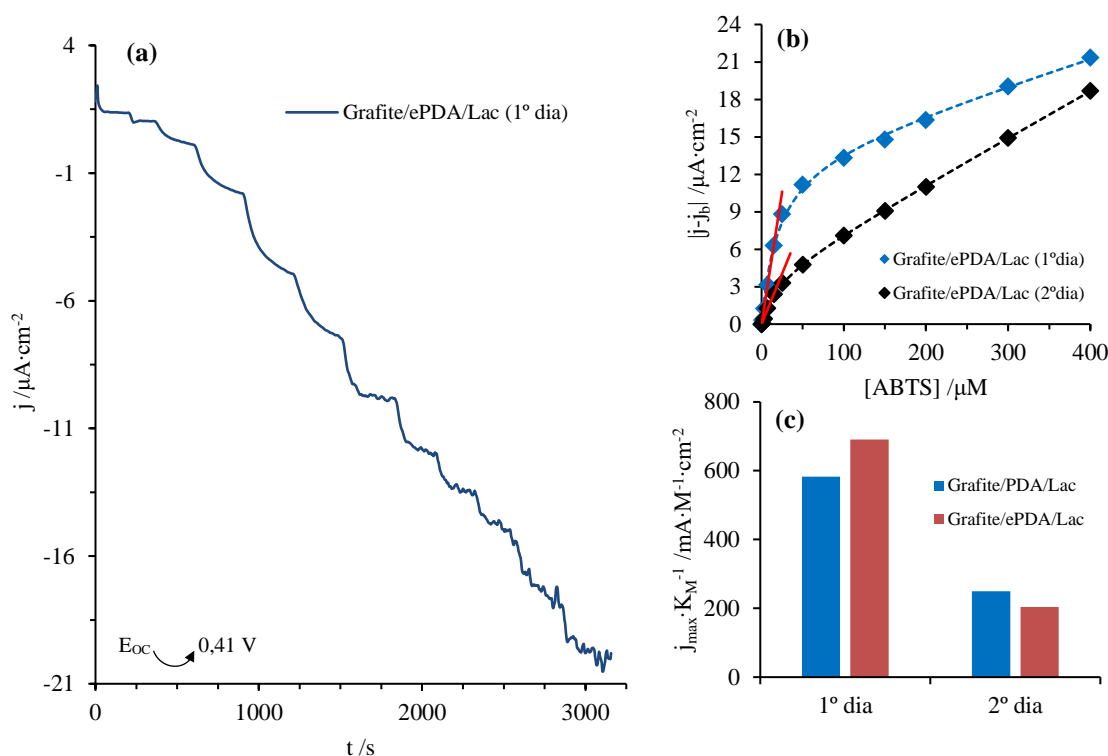


Figura 4.6: Resposta cronoamperométrica do eletrodo grafite/ePDA/Lac ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) no primeiro dia de utilização obtida pela aplicação do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 400 μM (a); Curvas de resposta ajustadas para as correntes catalíticas ($j-j_b$) referentes ao primeiro e segundo dia de utilização do mesmo eletrodo modificado (b); Eficiências catalíticas (j_{\max}/K_M) dos eletrodos modificados com lacase imobilizada em polidopamina espontânea e eletrossintetizada, no primeiro e segundo dias de utilização (c).

Ao contrário das curvas catalíticas que têm vindo a ser relatadas neste trabalho, a cinética dos eletrodos modificados nem sempre seguiu a equação de Michaelis-Menten (equação 4.1). Tal como mostra a figura 4.6b, a curva de resposta do eletrodo grafite/ePDA/Lac não segue uma cinética de Michaelis-Menten já que a sua resposta não tende a atingir um patamar de saturação a concentrações elevadas. Em vez disso, ocorre o estabelecimento de uma região linear a concentrações elevadas (100 a 400 μM), a qual sugeriu a seguinte equação modificada de Michaelis-Menten:

$$j = \frac{j_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} + m[S] \quad (\text{Equação 4.2})$$

Onde:

- j , é a densidade de corrente catalítica em $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$;
- j_{\max} , é a densidade de corrente máxima em $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$;
- K_M , é a constante de Michaelis-Menten aparente do substrato S, em μM ;
- m , é um fator linear empírico;
- $[S]$, é a concentração do substrato S, em μM .

Introduzindo a componente linear $m[S]$ foi possível ajustar uma curva que descreve com precisão os perfis cinéticos registados, mantendo acessível o ajuste dos parâmetros da cinética de Michaelis-Menten. No entanto, não foi encontrada uma correlação fidedigna entre as condições experimentais e o surgimento da componente linear. Ainda assim descartam-se como causas deste comportamento o uso

de filmes químicos ou eletroquímicos de polidopamina. Suspeita-se que a porosidade pouco controlável da grafite ou alguma impureza do preparado de lacase possam ser a causa do comportamento linear.

Foram ajustados parâmetros cinéticos para o elétrodo grafite/ePDA/Lac recorrendo ao *software Origin*, permitindo averiguar a evolução do desempenho catalítico do primeiro para o segundo dia (tabela 4.2). Relativamente à constante K_M constatou-se uma grande proximidade com o valor obtido para a lacase livre (18,5 μM) o que revela uma ótima capacidade da polidopamina eletrossintetizada em imobilizar lacase sem perturbar a afinidade enzima-substrato. Segundo as caracterizações eletroquímicas dos filmes químicos e eletroquímicos, a composição em quinonas aparentou ser semelhante nos dois tipos de filme, podendo assim conjecturar-se uma diferente distribuição destes grupos imobilizadores para explicar a menor influência na estrutura tridimensional da lacase imobilizada. Igualmente muito importante foi a constatação de que a afinidade se manteve intacta no segundo dia de utilização (ver tabela 4.2), ao contrário do que se tinha verificado nos elétrodos baseados em polidopamina quimicamente sintetizada (ver tabela 4.1).

A eficiência catalítica dos dois casos pode ainda ser comparada recorrendo aos valores calculados da razão j_{max}/K_M ^[133]. Como se observa no gráfico de barras da figura 4.6c, uma catálise mais eficiente foi atingida ao utilizar ePDA como matriz de suporte. No entanto no segundo dia de utilização ambas as plataformas perderam eficiência catalítica devido à perda de quantidade de enzima ativa na superfície. Novamente se reforça a importância para uma estratégia de estabilização da quantidade de enzima nos elétrodos, que poderia passar pelo recobrimento destas superfícies com um segundo filme protetor. Note-se que a diminuição da corrente de saturação no caso do elétrodo grafite/ePDA/Lac foi de 71%, ou seja maior do que a queda de 53% no elétrodo grafite/PDA/Lac. Pode dar-se o caso da polidopamina espontânea apresentar uma porosidade mais compatível com a dimensão da lacase e/ou uma maior espessura que dificulte a perda de massa enzimática. Assim sendo uma otimização mais fina do crescimento potenciodinâmico poderia ser levada a cabo, assim como o uso de outros métodos eletroquímicos de síntese por forma a acertar a porosidade.

Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos ajustados para a resposta amperométrica do elétrodo grafite/ePDA/Lac à adição de ABTS, no primeiro e segundo dias de utilização.

Dia	Ajuste não-linear				
	K_M / μM	j_{max} / $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	$j_{\text{max}}\cdot K_M^{-1}$ / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	m / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2
1º	19,8	13,7	691	20,5	0,9970
2º	19,7	4,0	204	37,1	0,9996

Tendo em vista a aplicabilidade do elétrodo grafite/ePDA/Lac na área dos biossensores, estabeleceram-se os intervalos de resposta linear para a deteção do ABTS – ver tabela 4.3. O surgimento de duas regiões de resposta linear torna o elétrodo num biossensor mais versátil com a capacidade de responder a altas e baixas concentrações de analito. Uma vez entendido o motivo do comportamento linear a altas concentrações, as plataformas baseadas em polidopamina, lacase e grafite, tornar-se-iam extremamente interessantes do ponto de vista de controlo de qualidade direto em processos industriais, assim como na deteção indireta de quantidades menores. Relativamente ao intervalo a baixas concentrações de ABTS, obtiveram-se gamas lineares menos amplas comparativamente com o elétrodo baseado em polidopamina química. Em todo o caso, a sensibilidade determinada para o primeiro dia de utilização do grafite/ePDA/Lac foi superior e semelhante no segundo dia, o que justificaria a utilização de ePDA para uma preparação rápida e controlável de biossensores.

Tabela 4.3: Parâmetros analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/ePDA/Lac a baixas e altas concentrações de ABTS, no primeiro e segundo dias de utilização

Dia	Ajustes lineares					
	Intervalo / μM	Sensibilidade / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2	Intervalo / μM	Sensibilidade / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2
1º	1 - 15	424	0,9977	100 - 400	26,9	0,9969
2º	1 - 7	162	0,9914	50 - 400	39,5	0,9992

Resumindo, a polidopamina eletrossintetizada revelou um grande potencial na criação de biossensores de lacase visto ter possibilitado o aumento da eficiência catalítica e sensibilidade quando comparada com a polidopamina espontânea. São necessários ultrapassar obstáculos relativos à quantidade de enzima imobilizada e à estabilidade operacional que, uma vez ultrapassados, poderão tornar a eletrossíntese numa via sintética mais vantajosa na modificação de superfícies condutoras.

Capítulo 5

Biossensores de carbono baseados em
PDA, Lacase e Nanopartículas

5. Biossensores de carbono baseados em PDA, Lacase e Nanopartículas

5.1. Caracterização de nanopartículas PDA@NPs por Espectroscopia UV-Visível

No seguimento do principal objetivo deste trabalho – melhorar o desempenho catalítico da lacase imobilizada – pretendeu-se desenvolver estratégias de incorporação de nanopartículas de magnetite em superfícies grafíticas modificadas com polidopamina e lacase. Tal como mencionado anteriormente, a magnetite de dimensão nanométrica tem sido reportada como um material catalítico em variados processos eletroquímicos de superfície^{[134],[135]}, demonstrando o seu grande potencial em melhorar o desempenho de biossensores. Relativamente à sua estrutura cristalina, a magnetite destaca-se dos restantes polimorfos de óxido de ferro por conter ferro divalente para além do ferro trivalente, o que lhe confere propriedades eletrónicas interessantes^[57] e simultaneamente uma maior suscetibilidade em ambientes oxigenados^{[58],[60]}. As estratégias de modificação das nanopartículas são portanto essenciais para proteger, estabilizar e funcionalizar a superfície de óxido de ferro. Tirando partido da afinidade entre o ferro e os átomos de oxigénio e nitrogénio presentes na polidopamina, demonstrou-se ser possível modificar as nanopartículas em arquiteturas *core-shell*^{[136],[137]} ou incorporá-las em nanocompósitos de Fe₃O₄-PDA^[138]. Tendo em mente esta possibilidade, a polidopamina pode assim atuar como agente protetor e funcional, tornando as nanopartículas suscetíveis à ligação covalente de biomoléculas como a lacase.

De modo a comprovar a compatibilidade entre a magnetite e a polidopamina, realizou-se um ensaio de caracterização UV-Vis apresentado nas figura 5.1a e b. Note-se que a modificação foi realizada de acordo com as condições descritas no primeiro passo do método B (secção 2.3.3.2) na ausência de lacase. Após 1 hora de incubação retirou-se uma alíquota da suspensão contendo PDA@NPs, submetendo esse volume a uma separação magnética e 3 lavagens com água por forma a remover todos os solutos.

Como se pode observar na figura 5.1a, o espectro da suspensão das partículas modificadas (PDA@NPs) apresenta dois picos de absorção a 225 e 280 nm e ainda uma banda larga centrada a 620 nm. Os picos bem definidos são característicos de duas transições eletrónicas de catecolaminas associadas ao grupo hidroquinona^{[112],[139]} comprovando assim a modificação das nanopartículas. Estes dois picos são igualmente observados no espectro de absorção da dopamina mas não surgem no espectro da suspensão de nanopartículas não-modificadas. Relativamente às bandas observadas nos espectros das partículas modificadas (620 nm) e não modificadas (470 nm), pode afirmar-se que se encontram numa região de várias transições eletrónicas da magnetite nanocristalina^{[140],[141],[142]}, o que explica a largura das bandas. Por outro lado, o desvio do pico de absorção comprova novamente a modificação das nanopartículas já que toma valores concordantes com a formação de complexos catecol-Fe(III)^{[55],[143],[144]}.

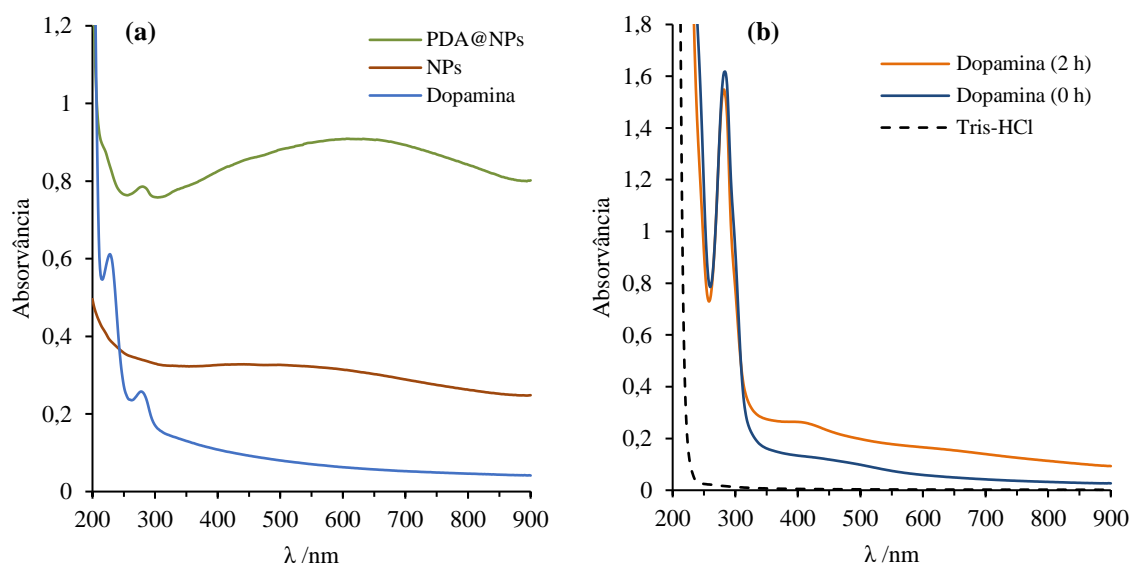


Figura 5.1: Espectros UV-Vis ($\ell = 1$ cm) de suspensões aquosas de nanopartículas de magnetite (NPs), de nanopartículas modificadas com polidopamina (PDA@NPs) e de solução aquosa de dopamina a $10 \mu\text{M}$ (a); Espectro UV-Vis ($\ell = 1$ cm) inicial da solução de polimerização diluída em água ($[\text{DA}]_i = 0,5 \text{ mM}$) e espectro da mesma solução após 2 horas (b).

Para além dos espectros de absorção das suspensões, foram obtidos espectros de alíquotas diluídas de uma solução de polimerização de dopamina sem nanopartículas (figura 5.1b). Após 2 horas de polimerização, observa-se uma maior absorção entre os 300 e 900 nm que reflete a presença de polidopamina dispersa, e o aparecimento de uma banda de absorção a 400 nm que se atribui à formação dos produtos de oxidação da dopamina ricos em grupos quinona^{[55],[90],[145]}. Seria expectável observar a mesma banda no espectro das partículas modificadas, no entanto a larga da banda de absorção das PDA@NPs (310 – 880 nm) não permitiu distinguir claramente outras transições menos intensas. De qualquer modo, ficou comprovada a funcionalização da magnetite nanocristalina, confirmando a versatilidade da polidopamina em cobrir superfícies de óxidos metálicos^[36] e tornando possível a posterior ligação com moléculas de lacase.

5.2. Comportamento eletroquímico de filmes modificados com PDA@NPs

Uma vez comprovada a modificação das nanopartículas de magnetite pretendeu-se investigar qual a sua influência na reação entre o substrato e o eléctrodo. Para tal foi preparado um filme de polidopamina modificado com nanopartículas PDA@NPs sobre um eléctrodo de grafite, seguindo o método B na ausência de lacase (secção 2.3.3.2). No primeiro passo, as nanopartículas foram modificadas com polidopamina com o intuito de proteger e funcionalizar a sua superfície, expetando-se assim uma interação mais estável entre nanopartículas e filme polimérico. No passo seguinte, a polimerização ocorreu na presença das nanopartículas PDA@NPs de modo a maximizar a quantidade incorporada no filme.

Prosseguiu-se com a caracterização eletroquímica do filme modificado executando um varrimento de potencial durante 3 ciclos a 10 mV/s (figura 5.2a). Foram observados os picos redox associados à oxidação de quinonas ($E_p^a = 0,37 \text{ V}$) e redução de hidroquinonas ($E_p^c = 0,21 \text{ V}$) que comprovam a deposição de material eletroativo na grafite após polimerização. Novamente se constatou um decréscimo nas intensidades de pico de corrente em ciclos sucessivos, tanto no filme modificado com PDA@NPs como num filme não modificado crescido em grafite (figura 5.2a). Este comportamento

é característico de um filme de polidopamina, tal como foi anteriormente discutido (secção 3.1.2), e sugere uma composição maioritária semelhante nos dois casos. Por outro lado, a incorporação das nanopartículas PDA@NPs afetou a quantidade de polidopamina depositada no eléctrodo, o que justifica a maior intensidade de corrente e os desvios nos potenciais de pico comparativamente com o filme não modificado. Note-se que não foi observada nenhuma conversão redox do tipo $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, o que é expectável pela pouca quantidade imobilizada, pela presença do filme de polidopamina e ainda pela superfície das nanopartículas se encontrar modificada com o mesmo filme. É possível detetar eletroquimicamente as nanopartículas de magnetite imobilizadas apenas em superfícies muito organizadas e eletronicamente acessíveis^[69]. Para além disso, a ausência de conversões redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ sustenta a ideia que uma cobertura com polidopamina protege as nanopartículas de sofrerem degradação oxidativa.

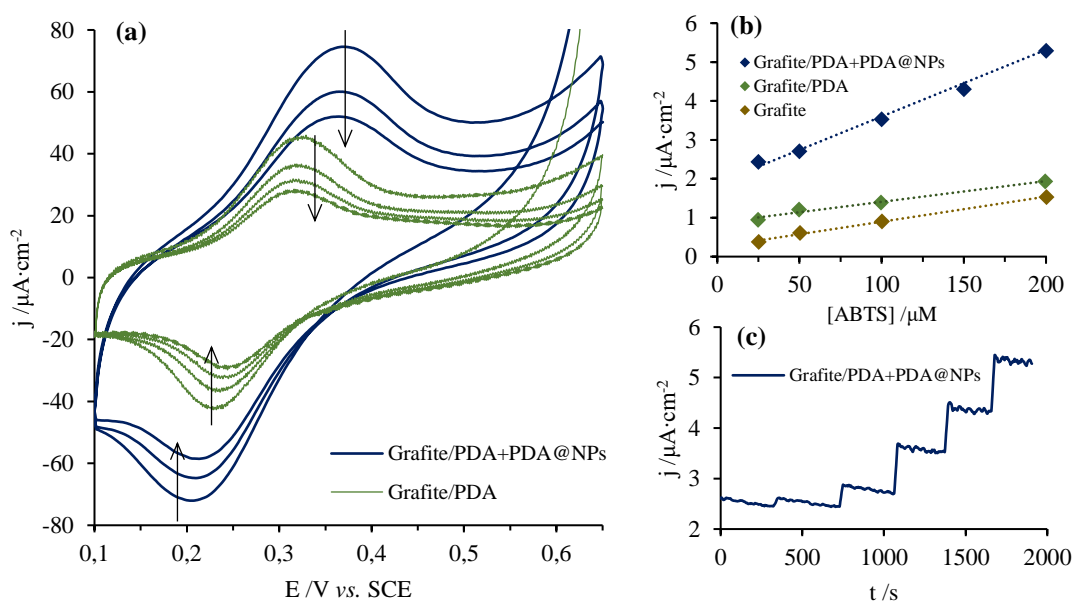


Figura 5.2: Primeiros voltamogramas cíclicos do eléctrodo de grafite ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) modificado com um filme de polidopamina (PDA) e do eléctrodo modificado com nanopartículas de magnetite incorporadas em polidopamina (PDA+PDA@NPs), registados a 10 mV/s – setas indicam a evolução dos picos de corrente com o avanço dos ciclos de varrimento (a); Densidades de corrente dos eléctrodos grafite, grafite/PDA e grafite/PDA+PDA@NPs após aplicação do pulso simples $E_{\text{OC}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ com adições sucessivas de ABTS a 25, 50, 100, 150 e 200 μM (b); Cronoamperograma do eléctrodo grafite/PDA+PDA@NPs (c) nas mesmas condições do ensaio b. Em todos os casos o eletrólito consistiu numa solução arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.

Em seguida realizou-se um ensaio cronoamperométrico do filme modificado com PDA@NPs nas mesmas condições em que é avaliada o desempenho catalítico dos eléctrodos modificados com lacase. Deste modo pretendia-se entender se as nanopartículas de magnetite imobilizadas possuíam alguma reatividade e/ou catálise dirigida ao ABTS. Começando por analisar o perfil das correntes patamar no eléctrodo limpo de grafite (figura 5.2b), após introduzir ABTS na solução eletrolítica a concentrações sucessivamente superiores, desenvolveram-se correntes positivas cujas intensidades aumentaram linearmente com a concentração ($6,4 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). O carácter anódico das correntes revela que a espécie predominante próxima do eléctrodo é a forma reduzida de ABTS, concordando com a composição reportada em solução aquosa^[146] e confirmando que a grafite não catalisa a formação do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$. No caso do eléctrodo grafite/PDA, registaram-se correntes superiores para cada adição de ABTS mantendo uma sensibilidade semelhante ($5,3 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) ao eléctrodo de grafite não modificado. Tal observação é explicada pela contribuição da oxidação dos grupos HQ presentes na

superfície. Enquanto que o eletrodo grafite/PDA apresenta algum bloqueio à transferência eletrônica comparativamente com a grafite, o eletrodo modificado com PDA@NPs apresentou uma sensibilidade melhorada ($17,2 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) que se retira da resposta mais acentuada no perfil de correntes (figura 5.2c). Uma vez que apenas um aumento na área superficial real do eletrodo não explica o aumento de sensibilidade, conclui-se que as nanopartículas de magnetite incorporada no filme de PDA são o componente responsável por aumentar a sensibilidade do eletrodo. Será necessário um estudo mais aprofundado da cinética redox do ABTS na presença das nanopartículas.

Através dos ensaios cronoamperométricos ficou comprovada que a incorporação das nanopartículas de magnetite no filme de polidopamina aumenta as correntes faradaicas de espécies eletroativas e que por esse motivo são um elemento interessante para aumentar a sensibilidade da detecção amperométrica em superfícies de eletrodo.

5.3. Caracterização dos eletrodos de Grafite/PDA/Lac+NPs

Com o intuito de melhorar a atividade catalítica da lacase, prosseguiu-se com a modificação de filmes de polidopamina com lacase e nanopartículas de magnetite. Existem inúmeras possibilidades em co-imobilizar dois componentes num filme polimérico. Iniciou-se primeiramente com a incubação de um eletrodo de grafite/PDA por 3 horas no preparado de lacase contendo 2 mg/mL de nanopartículas suspensas. Pretendeu-se assim testar a capacidade da polidopamina formada espontaneamente em reter as nanopartículas e qual a sua influência na catálise enzimática.

Pela análise dos voltamogramas cíclicos da figura 5.3a, verificou-se não só a presença da lacase imobilizada na superfície como também a presença de nanopartículas. O perfil sigmoidal dos voltamogramas, assim como a intensificação das correntes anódicas provocada pela adição de ABTS verifica a ocorrência da catálise promovida pela lacase. Do mesmo modo os cronoamperogramas registados alternadamente com os voltamogramas verificam o aumento da concentração superficial de substrato oxidado (figura 5.3b). Por outro lado, observa-se um pico de redução a $0,19 \text{ V}$ no último voltamograma ($200 \text{ } \mu\text{M}$ ABTS) que se atribui à redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} proveniente das nanopartículas. O surgimento do pico redução no final da experiência sugere que ocorreu degradação de parte das nanopartículas, já que nenhuma proteção foi realizada previamente. A presença das nanopartículas não afetou o tipo de cinética enzimática, que novamente seguiu a equação de Michaelis-Menten, tal como se observa pelas curvas de respostas obtidas a partir dos cronoamperogramas (figura 5.3c). Os parâmetros cinéticos ajustados podem ser consultados na tabela 5.1.

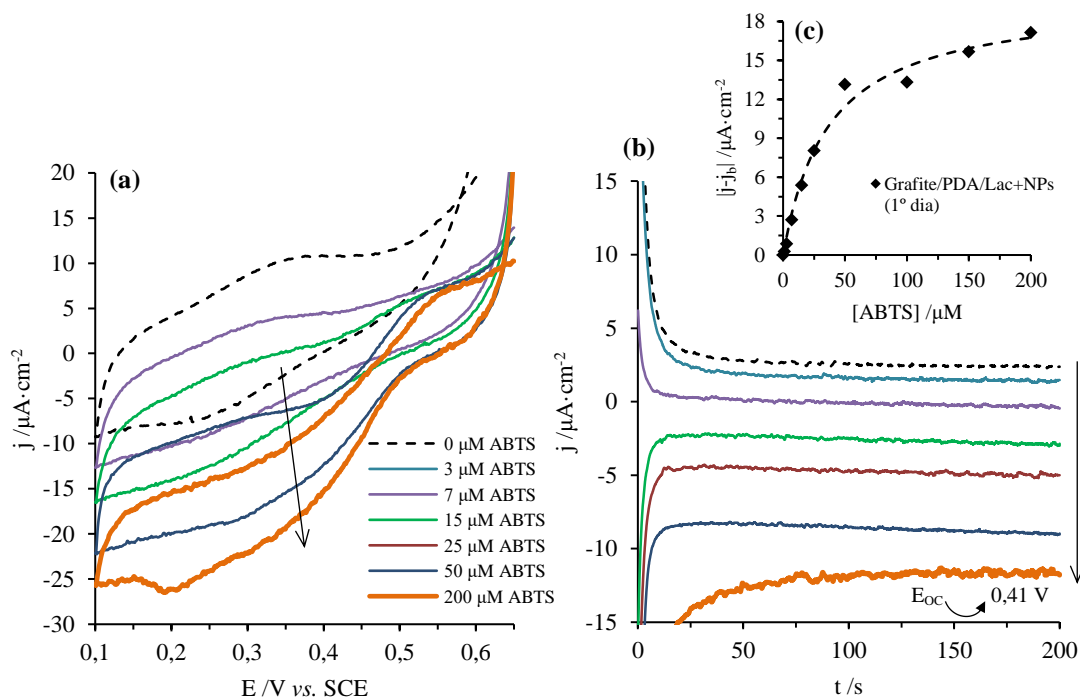


Figura 5.3: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo grafite/PDA/Lac+NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registado a 2 mV/s (a) e cronoamperogramas resultantes do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ (b), em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 contendo ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100 e 200 μM – as setas indicam o sentido da evolução da corrente com o aumento de concentração de substrato; Curvas Michaelis-Menten obtidas a partir das correntes catalíticas ($j - j_b$) amperométricas do eléctrodo grafite/PDA/Lac+NPs do primeiro dia de utilização (c).

No dia seguinte de utilização continuou-se a observar o pico de redução associado às nanopartículas durante os ensaios eletroquímicos (figura 5.4a), corroborando com o facto das nanopartículas serem suscetíveis à oxidação^[58] e consequentemente terem as suas propriedades eletroquímicas comprometidas. Mais adiante recorrer-se-á à modificação das nanopartículas com polidopamina de forma a prevenir a sua degradação antecipada.

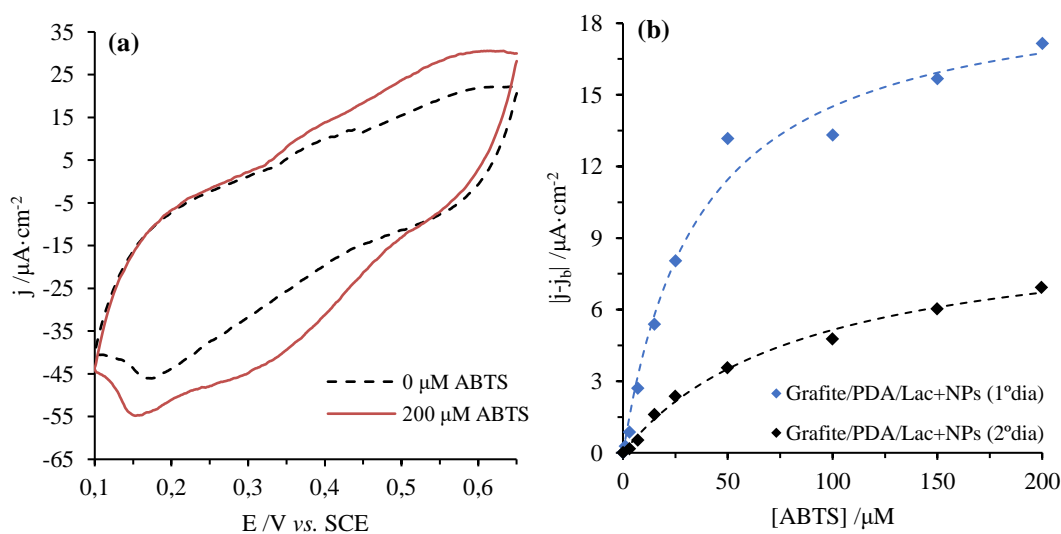


Figura 5.4: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo grafite/PDA/Lac+NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registados a 10 mV/s na ausência e presença de ABTS (200 μM) no segundo dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de

corrente catalíticas (j_{b}) no primeiro e segundo dia de utilização do eletrodo modificado, construídas a partir das correntes patamar cronoamperométricas ($E_{\text{oc}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$) na presença de ABTS nas concentrações 0, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (b). Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.

Semelhantemente, foi observada a resposta do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs no segundo dia (figura 5.4b), tendo-se registado correntes catalíticas menos intensas comparativamente ao primeiro ensaio. Neste caso, a queda de atividade enzimática foi caracterizada pelo agravamento de todos os parâmetros determinados com a exceção do intervalo de deteção linear (tabela 5.1). Notoriamente o valor de K_{M} aumentou 2,4 vezes relativamente à primeira utilização tonando-se o valor mais alto de todas as interfaces modificadas com polidopamina e lacase. Entende-se por isso que a degradação oxidativa das nanopartículas prejudica a atividade catalítica dos filmes modificados com lacase. Antagonicamente, no primeiro dia, as partículas presentes no filme não prejudicaram a catálise enzimática porque não estavam degradadas, tendo-se determinado parâmetros muito próximos do eletrodo grafite/PDA/Lac (tabela 5.1). Conclui-se assim que para usufruir das propriedades catalíticas das nanopartículas é necessário, não só utilizar uma metodologia protetora, como também criar um nanoconjugado a partir do qual se observe um efeito sinérgico.

Tabela 5.1: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA/Lac+NPs à adição de ABTS, no primeiro e segundo dia de utilização.

Dia	Ajuste Michaelis-Menten				Ajuste linear		
	K_{M} / μM	j_{max} / $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	$j_{\text{max}}\cdot K_{\text{M}}^{-1}$ / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2	Intervalo / μM	Sensibilidade / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2
1º	36,5	19,8	543	0,9849	1 - 25	334	0,9921
2º	87,2	9,6	111	0,9926	1 - 25	97	0,9853

5.4. Comportamento catalítico de filmes de polidopamina modificados com conjugados Lac&PDA@NPs

No seguimento das conclusões retiradas anteriormente, explorou-se as potencialidades da polidopamina para funcionalizar as nanopartículas de magnetite com os grupos quinona, permitindo assim conjugá-las com lacase. Seguindo o primeiro passo do método B, modificaram-se as nanopartículas com lacase e PDA, que após separação magnética e lavagens com tampão Tris-HCl, foram re-suspensas em 10 mM de dopamina no mesmo tampão. O referido passo de separação magnética e lavagem teve o objetivo de garantir que a posterior imobilização seria exclusivamente de lacase conjugada com as nanopartículas. Seguidamente uma grafite limpa foi submersa na suspensão de Lac&PDA@NPs e dopamina durante 1 hora, permitindo a formação de um filme modificado. Ao polimerizar a dopamina na presença dos conjugados, pretendia-se maximizar a quantidade imobilizada tirando partido de um eventual efeito de aprisionamento e consequente ligação covalente entre o filme de PDA e a cobertura presente nas partículas modificadas.

Ao executar os primeiros varrimentos de potencial, observaram-se os dois picos associados à conversão redox Q/QH ($E_{\text{p}}^{\text{a}} = 0,42$; $E_{\text{p}}^{\text{c}} = 0,14\text{V}$), caracterizados por serem largos e de intensidade elevada (figura 5.5a). Comparativamente com o filme de PDA e com o filme PDA+PDA@NPs crescidos em grafite, o filme modificado com Lac&PDA@NPs apresentou intensidades de pico notoriamente superiores. Enquanto que a carga associada aos picos reflete uma maior quantidade de material eletroativo depositado, os desvios positivos no E_{p}^{a} e negativos no E_{p}^{c} sugerem um filme mais espesso.

Possivelmente a presença dos conjugados na solução de incubação catalisou a polimerização da dopamina, uma vez que, apesar do pH não ser ótimo, a lacase é reportada como catalisador da polimerização de derivados de catecol^{[147],[148],[149]}. Este resultado revela ser muito promissor ao sugerir que os conjugados sintetizados apresentam propriedades catalíticas relativamente a compostos fenólicos, tornando-os assim ideais na criação de plataformas biossensíveis. Como referido anteriormente, o uso do substrato ABTS durante este trabalho serviu apenas para caracterizar facilmente os desempenhos catalíticas das várias interfaces preparadas, já que o real interesse em imobilizar lacase consiste na sua versatilidade em reagir com compostos fenólicos importantes para o tratamento de águas, indústria alimentar, farmacêutica, entre outras^{[2],[20]}.

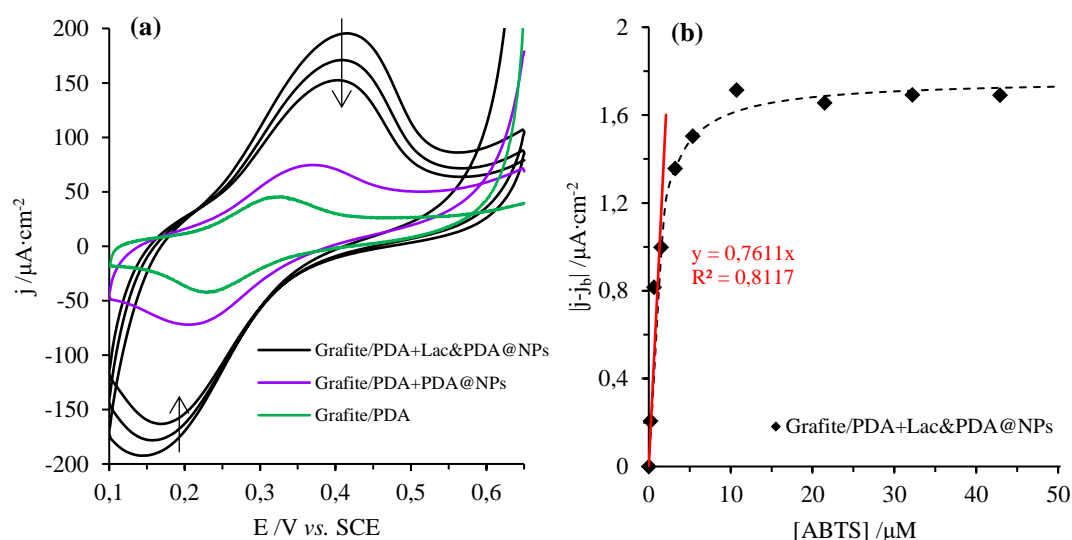


Figura 5.5: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo de grafite/PDA, grafite/PDA+PDA@NPs e grafite/PDA+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registados a 10 mV/s em tampão arejado citrato-fosfato de pH 4,6 (a) – setas indicam a evolução das densidades de corrente de pico com o avanço do varrimento de potencial; Curva Michaelis-Menten ajustada para as densidades de corrente catalíticas (j_{a}) obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{\text{oc}} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ ao eléctrodo grafite/PDA+Lac&PDA@NPs na presença de ABTS nas concentrações 0,2; 0,6; 1,5; 3,2; 5,3; 11; 21; 32 e $43 \text{ }\mu\text{M}$ (b).

O desempenho catalítico do filme modificado com Lac&PDA@NPs foi determinada cronamperometricamente resultando na curva apresentada na figura 5.5b e nos parâmetros ajustados da tabela 5.2. Pelo bom ajuste da cinética enzimática ao perfil catalítico hiperbólico, confirma-se a presença de lacase ativa imobilizada que, pelo método utilizado, provém necessariamente da imobilização de conjugados lacase-NPs. Não só se modificou com sucesso as nanopartículas, como se obteve um filme de alta afinidade para o ABTS tal como expressa o baixo valor de K_M ($1,0 \text{ }\mu\text{M}$). A constante determinada é muito menor do que a constante para a lacase livre ($18,5 \text{ }\mu\text{M}$) e também menor do que os valores reportados na literatura de lacases fúngicas ($4 - 770 \text{ }\mu\text{M}$)^{[22],[124],[128]}. Por esse motivo se pode afirmar que a conjugação resultou num efeito catalítico caracterizado pela alteração das velocidades relativas dos passos reacionais enzimáticos. Mais se acrescenta que as propriedades eletroquímicas das nanopartículas e a sua proximidade com a lacase, deverão ter sido os fatores responsáveis pelo melhoramento da afinidade.

O efeito catalítico dos conjugados Lac&PDA@NPs é igualmente expresso pelos altos valores de j_{max}/K_M e de sensibilidade linear. No entanto, contatou-se uma baixa corrente de saturação assim como um intervalo de resposta linear estreito. Suspeita-se que tal resultado seja consequência de uma baixa quantidade superficial de lacase, uma vez que depende do número de lacases ligadas a cada

nanopartícula e também da quantidade de conjugados imobilizados no filme. Futuramente seria interessante otimizar os passos de modificação e imobilização destes conjugados para entender quais as condições experimentais que mais influenciam a sua resposta catalítica final. Note-se que a síntese bem-sucedida dos conjugados Lac&PDA@NPs, revela como a polidopamina é um agente versátil na modificação de materiais, tendo permitido conjugar o material proteico de uma biomolécula com a superfície inorgânica do óxido de ferro.

Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos e analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA+Lac&PDA@NPs à adição de ABTS.

Ajuste Michaelis-Menten				Ajuste linear		
K_M / μM	j_{max} / $\mu A \cdot cm^{-2}$	$j_{max} \cdot K_M^{-1}$ / $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$	R^2	Intervalo / μM	Sensibilidade / $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$	R^2
1,0	1,76	1814	0,9839	0,2 - 1,5	761	0,8117

5.5. Caracterização dos sensores Grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs

Após se ter constatado a catálise promissora dos conjugados Lac&PDA@NPs pretendeu-se continuar a explorar a modificação de superfícies gráficas baseada em polidopamina. Assim sendo, foi proposto e executado o método B que consistiu num primeiro passo de conjugação lacase-NP seguido por um segundo passo de imobilização na presença de lacase e conjugados. A implementação de dois passos em vez de um único, teve como objetivo garantir a combinação lacase-NPs de onde provém os benefícios catalíticos e garantir a proteção das nanopartículas antes da sua imobilização. Por outro lado, pretendeu-se novamente tirar partido do aprisionamento ou encapsulamento dos vários componentes na matriz polimérica, utilizando a mistura reacional do primeiro passo para a polimerização no segundo passo. Será expectável que o filme modificado de polidopamina contenha lacase, Lac&PDA@NPs e possivelmente PDA@NPs, no entanto denominar-se-á o eletrodo modificado como grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs.

Após lavagem o eletrodo modificado foi caracterizado por voltametria cíclica e cronoamperometria (figura 5.6a e c) nas condições já descritas anteriormente. Pelos voltamogramas cíclicos registados na presença e ausência de ABTS é possível inferir que o filme é catalítico para este substrato. Na presença de ABTS o voltamograma toma uma forma sigmoideal caracterizada pela ausência do pico de oxidação do substrato, confirmando assim a sua oxidação enzimática. Ao aplicar um potencial de igual valor ao E_p^c do substrato oxidado ($ABTS^{+}$) é igualmente possível detetar a resposta catalítica através do desenvolvimento de patamares de corrente sucessivamente mais negativos à medida que é adicionado substrato à solução eletrolítica (figura 5.6c). Utilizando a equação 4.2 ajustou-se a curva catalítica da figura 5.6b referente ao eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs, obtendo os parâmetros da tabela 5.3.

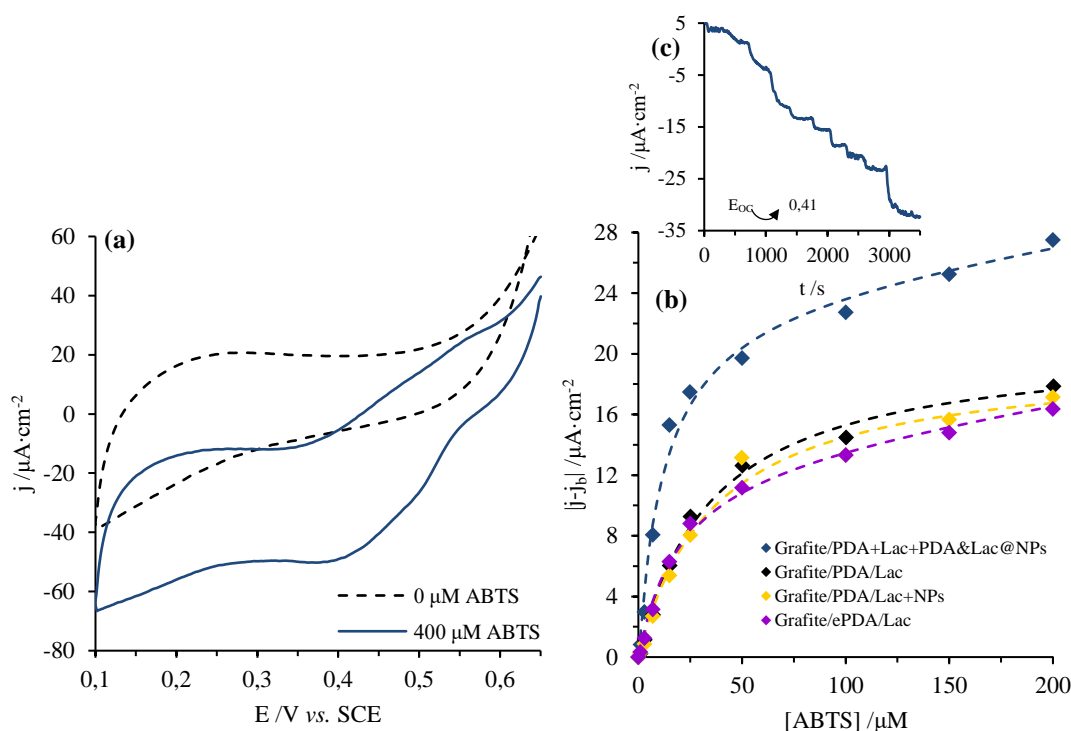


Figura 5.6: Voltamogramas cíclicos do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) registados a 10 mV/s na ausência e presença de ABTS ($200 \mu\text{M}$) no primeiro dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) produzidas na primeira utilização dos eletrodos de grafite modificados com polidopamina, lacase e nanopartículas em diferentes arquiteturas (b); Cronoamperograma do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs obtido pela aplicação do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ na presença de ABTS nas concentrações $1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150$ e $200 \mu\text{M}$ (c); Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a $\text{pH } 4,6$.

As correntes catalíticas do filme modificado com lacase e Lac&PDA@NPs foram notoriamente superiores às correntes dos restantes filmes preparados por incubação, o que reflete principalmente uma maior quantidade de material catalítico imobilizado no primeiro caso. Não só se determinou uma corrente de saturação superior, como também se obteve um baixo valor de K_M ($12,7 \mu\text{M}$), abaixo do valor obtido para o enzima livre ($18,5 \mu\text{M}$). Como se constatou anteriormente que os conjugados permitem atingir baixos valores de K_M , conclui-se que o valor intermédio obtido ($10,6 \mu\text{M}$) deverá refletir a catálise dos conjugados assim como da lacase não conjugada. Pela consequente eficiência catalítica elevada foi determinada uma sensibilidade igualmente alta que atinge $1,04 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ no intervalo $1 - 15 \mu\text{M}$ de ABTS. Comparativamente com sensibilidades reportadas de superfícies modificados com lacase em ouro ($0,1 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)^[69], platina ($0,6 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)^[132] e grafite ($0,5 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)^[131], o eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs desenvolvido neste trabalho destaca-se notoriamente. Existe por isso uma grande potencialidade para o uso deste tipo de eletrodo para a deteção e quantificação de variados compostos fenólicos^{[2],[20]}.

Novamente se testou o eletrodo modificado após alguns dias de armazenamento no frigorífico, nunca se verificando a degradação das nanopartículas modificadas. Como se pode observar nos voltamogramas registados no 5º dia de utilização (figura 5.7a), observa-se uma resposta catalítica sem o aparecimento do pico de redução a $0,19 \text{ V}$ indicativo da solubilização de iões Fe^{3+} .

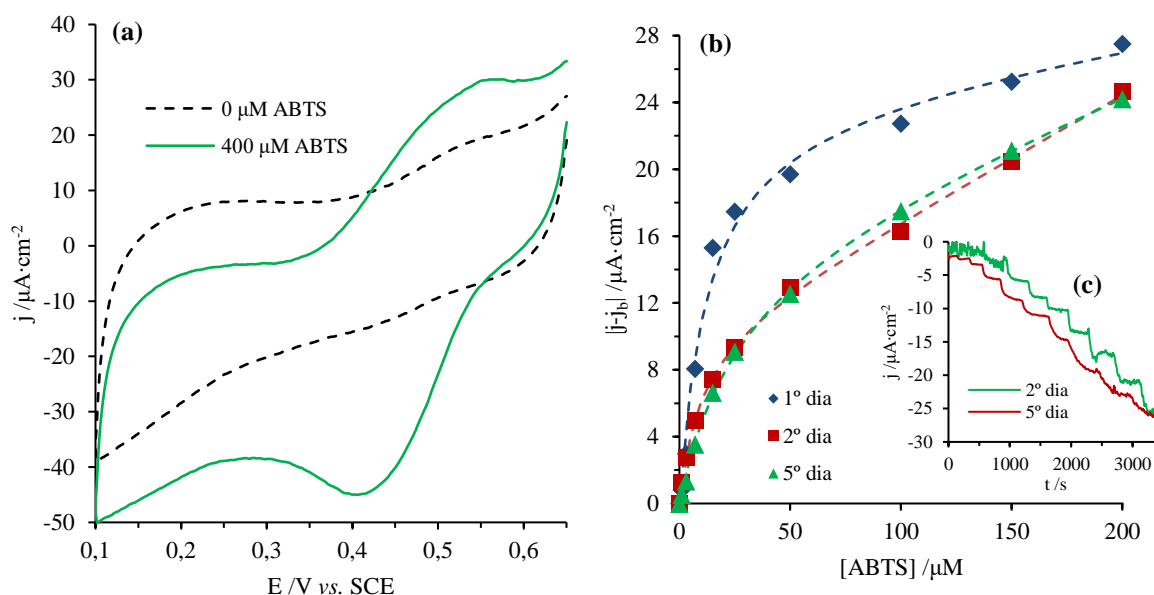


Figura 5.7: Voltamogramas cíclicos do eléctrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs ($A = 2,9 \text{ cm}^2$) na ausência e presença de ABTS (400 μM) no quinto dia de utilização (a); Curvas Michaelis-Menten ajustadas para as densidades de corrente catalíticas ($j-j_b$) do mesmo eléctrodo no primeiro, segundo e quinto dia de utilização (b); Cronoamperogramas obtidas pela aplicação do pulso simples $E_{oc} \rightarrow 0,41 \text{ V}$ na presença de ABTS nas concentrações 1, 3, 7, 15, 25, 50, 100, 150 e 200 μM (c); Durante os ensaios a solução eletrolítica encontrava-se arejada e tamponada com citrato-fosfato a pH 4,6.

Após alguns dias de utilização o eléctrodo continuou sensível à adição de ABTS, como se pode constatar nos cronoamperogramas da figura 5.7c. Apesar de ter ocorrido uma perda de atividade do primeiro para o segundo dia, passados mais 3 dias o eléctrodo apresentou correntes catalíticas com intensidades muito coerentes com o segundo dia (figura 5.7b). Tal como se tem vindo a verificar, a polidopamina não só permite imobilizar os componentes catalíticos como tem um efeito estabilizador na resposta dos eléctrodos modificados.

Tabela 5.3: Parâmetros cinéticos ajustados para a resposta amperométrica do eléctrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs à adição de ABTS no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.

Dia	Ajuste não linear				
	K_M / μM	j_{\max} / $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	$j_{\max}\cdot K_M^{-1}$ / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	m / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2
1º	10,6	21,8	2055	36	0,9863
2º	10,9	11,3	1042	66	0,9988

Relativamente aos intervalos de resposta linear, determinaram-se gamas habituais para a detecção de ABTS^{[29],[69],[131],[132]} – ver tabela 5.4. Apesar do decréscimo de atividade do primeiro para o segundo dia, as sensibilidades mantiveram-se elevadas ao longo das várias utilizações. Novamente se verificou o estabelecimento de uma região linear com menor sensibilidade a concentrações elevadas de ABTS, conferindo ao eléctrodo uma maior versatilidade de utilização. É importante referir que a sensibilidade desta região é cerca de 10 vezes mais sensível do que a superfície de grafite não modificada ($7 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$), o que sugere a influência do material catalítico imobilizado.

Tabela 5.4: Parâmetros analíticos ajustados para a resposta amperométrica do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs a baixas e altas concentrações de ABTS, no primeiro, segundo e quinto dia de utilização.

Dia	Ajustes lineares					
	Intervalo / μM	Sensibilidade / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2	Intervalo / μM	Sensibilidade / $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	R^2
1º	1 - 15	1042	0,9953	50 - 200	52	0,9954
2º	1 - 7	752	0,9587	25 - 200	84	0,9928

Tratando-se da interface com maior sensibilidade na detecção de ABTS, procedeu-se à caracterização morfológica por AFM da superfície grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs antes e após modificação (figura 5.8), tal como descrito na secção experimental (2.4.3). Relativamente à imagem topográfica da grafite não modificada, observaram-se domínios micrométricos extremamente lisos correspondentes aos planos basais típicos de folhas de grafeno empilhadas^[66]. No entanto, a presença de vários defeitos nesta estrutura cristalina da grafite resulta numa textura irregular de rugosidade muito superior ao GC ($R_q = 4,36 \text{ nm}$) ou HOPG ($R_q = 0,42 \text{ nm}$) mencionados anteriormente. Notoriamente, esta textura escamada da grafite permitiu identificar inequivocamente a modificação da superfície após polimerização, ao contrário do que aconteceu com o uso do GC que apresenta uma textura granular. Para além disso, confirmou-se novamente uma influência importante da rugosidade inicial na rugosidade do filme crescido tal como nos outros substratos de carbono. Distintamente, o crescimento em grafite aparenta ser mais irregular já que resultou num aumento significativo da rugosidade. Especula-se a hipótese de que as arestas bem definidas da grafite atuem como locais aleatórios de nucleação uma vez que são conhecidas por terem diferente reatividade dos planos basais^[66]. Numa futura continuação deste tema de tese, seria importante correlacionar a rugosidade com a atividade catalítica da lacase imobilizada já que esse tipo de informação poderia melhorar a estabilidade operacional dos eletrodos.

Apesar das imagens topográficas permitirem comprovar a modificação da grafite, não foi possível distinguir os componentes individuais deste filme modificado, como sejam, moléculas de lacase e nanopartículas de magnetite. Em vez disso, a indicação de que o material depositado se trata de um compósito advém da superioridade na catálise observada para o ABTS. Possivelmente a utilização de espectroscopia de infravermelho ou a espectroscopia de fotoeletrão de raios-X poderiam provar diretamente a presença dos três componentes. Serão ainda necessárias algumas otimizações do método utilizado para melhorar o desempenho da grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs. No entanto, a facilidade de preparação e a obtenção de altas sensibilidades revelam, só por si, a potencialidade da conjugação de enzima e magnetite nanoparticulada recorrendo a polidopamina. Não só se poderia otimizar o método em termos de concentrações, pH e duração dos passos, como se poderia explorar a imobilização dos conjugados em filmes eletrossintetizados. Desse modo o controlo da espessura, rugosidade e propriedades eletroquímicas poderia ser mais rigoroso, culminando em respostas amperométricas mais reproduzíveis.

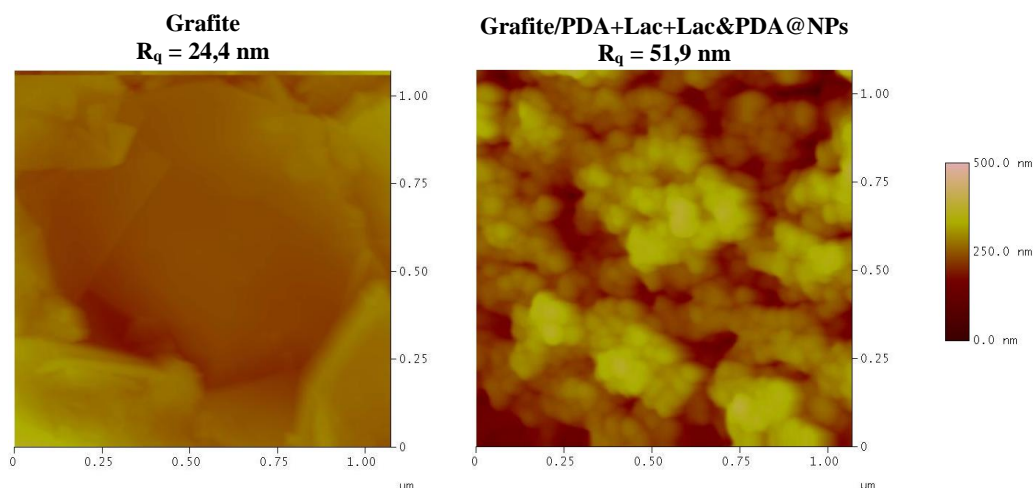


Figura 5.8: Imagens topográficas por AFM ($1,07 \times 1,07 \mu\text{m}^2$) e respectivas rugosidades (R_q) da superfície de grafite antes e após crescimento de um filme PDA+Lac+Lac&PDA@NPs.

5.6. Comparação entre as Plataformas de Grafite Modificadas

Ao longo da apresentação dos resultados foram reportadas variadas arquiteturas baseadas em filmes modificados de polidopamina que diferiram nos componentes imobilizados e métodos de preparação. Para permitir uma comparação eficaz dos vários filmes construiu-se o gráfico da figura 5.9, contendo os valores das constantes de Michaelis-Menten e as sensibilidades da resposta linear a concentrações baixas de ABTS. Realça-se o facto do K_M ser um parâmetro independente da quantidade de enzima imobilizada^[130] e por esse motivo ser indicado para comparar a cinética promovida pelos diferentes filmes. As sensibilidades por outro lado, não são independentes da quantidade imobilizada, no enquanto permitem avaliar as plataformas tendo em vista a sua aplicação na área dos biossensores.

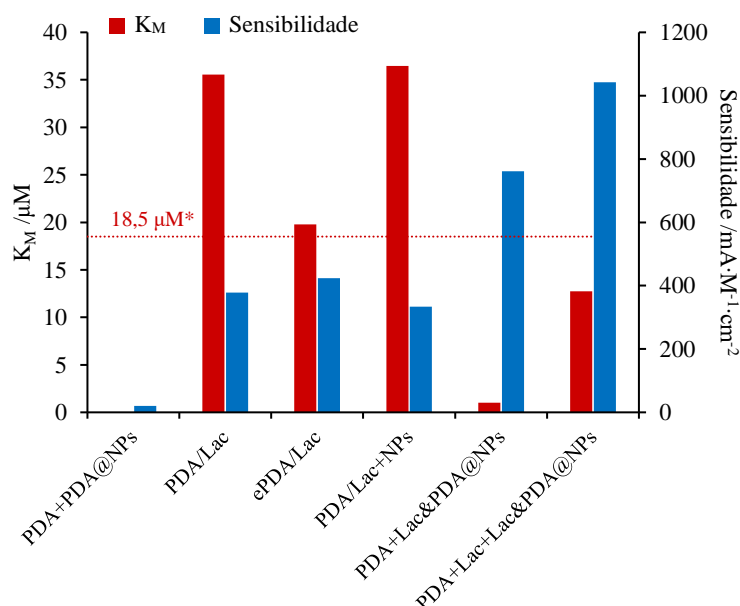


Figura 5.9: Gráfico comparativo dos valores de K_M e sensibilidades obtidas na primeira utilização das diferentes plataformas de grafite modificada com polidopamina, lacase e nanopartículas de magnetite (Fe_3O_4). * K_M determinado por voltametria cíclica com eletrodo de GC e lacase em solução (figura 4.1d).

De um modo geral pode afirmar-se que a conjugação da lacase com as nanopartículas permitiram melhorar a oxidação catalítica do ABTS e aumentar a sensibilidade da superfície modificada. Ao incorporar PDA@NPs num filme de polidopamina, obteve-se uma resposta intensificada pelas suas propriedades eletroquímicas que se traduziu numa sensibilidade de $21 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Como seria de esperar, um filme modificado apenas com nanopartículas não consegue competir com a catálise específica da lacase, uma vez que após a imobilização deste enzima atingiram-se sensibilidades 20 vezes superiores (PDA/Lac e ePDA/Lac). Note-se que as partículas PDA@NPs foram imobilizadas durante a polimerização para maximizar a quantidade retida no eléctrodo, enquanto que a lacase foi imobilizada após polimerização garantindo a imobilização covalente. Mesmo com menores chances de ficar imobilizada, a lacase demonstrou-se ativa em polidopamina espontânea e eletrossintetizada superando a sensibilidade do filme PDA+PDA@NPs.

Numa tentativa de melhorar as propriedades catalíticas dos filmes, imobilizaram-se as nanopartículas simultaneamente com a lacase sobre uma grafite/PDA no entanto, como estes componentes não estavam conjugados, nenhuma alteração significativa da resposta foi encontrada. De facto, o passo de conjugação demonstrou ser crucial para o melhoramento das sensibilidades e para o decréscimo do K_M . Como se pode observar no gráfico de barras (figura 5.9), as duas superfícies modificadas com os conjugados Lac&PDA@NPs manifestaram valores de K_M abaixo do valor determinado para o enzima livre ($< 18,5 \mu\text{M}$) assim como altas sensibilidades à detecção de ABTS. De igual modo, a metodologia baseada na incorporação dos conjugados durante a polimerização, deverá ter sido outro fator relevante nos ganhos de sensibilidade. Contrariamente, as três superfícies modificadas pela incubação do filme pré-sintetizado (PDA/Lac, ePDA/Lac e PDA/Lac+NPs) resultaram em sensibilidades menores que se revelaram, ainda assim, comparáveis a eléctrodos nobres modificados^{[69],[131],[132]}. De entre estas três superfícies, destaca-se a grafite modificada com polidopamina eletrossintetizada por não ter perturbado a afinidade lacase-ABTS comprovando assim que a interface biocompatível de PDA pode ser otimizada para a imobilização de biomoléculas através da sua eletrossíntese.

Resumindo, foi possível realizar uma análise comparativa das diferentes metodologias e arquiteturas de eléctrodo que originou importantes conclusões acerca da modificação baseada em PDA, Lac e NPs. O método de síntese e de modificação dos filmes influencia sem dúvida o desempenho final dos mesmos, assim como, a organização espacial da lacase e NPs na escala nanométrica. Outra conclusão importante não explicita no gráfico da figura 5.9, consiste na versatilidade da polidopamina em funcionalizar e proteger as nanopartículas, o que permitiu alcançar os altos desempenhos reportados neste trabalho.

Capítulo 6

Conclusões e Perspetivas Futuras

6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Impulsionado pelo desafio científico e tecnológico em desenvolver novos biossensores enzimáticos de deteção rápida e seletiva, o presente trabalho apresenta resultados promissores para a deteção de compostos fenólicos, decorrentes do estudo sistemático que se realizou sobre as propriedades da polidopamina enquanto plataforma imobilizadora. Graças às propriedades adesivas e biocompatibilidade da polidopamina e aos efeitos de melhoramento catalítico conferidos pelas nanopartículas de magnetite, foi construído um eletrodo modificado de grafite com alta sensibilidade para a deteção amperométrica do ABTS ($1,04 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$), enzimaticamente convertido por lacase. Uma vez que ficou comprovada a importância individual de cada componente e a adequação da metodologia de imobilização, a continuação deste tema deverá passar pela avaliação da resposta amperométrica a compostos fenólicos simples (por ex. catecol, ácido gálico, paracetamol), progredindo para a análise do teor fenólico de amostras alimentares ou ambientais mais complexas. Para além desta direção inerente à aplicabilidade do biossensor, existem ainda outros encaminhamentos possíveis, científicos ou tecnológicos, que provêm das conclusões detalhadas de cada capítulo:

- 1) No capítulo 3 foram observadas várias propriedades não reportadas anteriormente dos filmes de polidopamina crescidos em carbono vítreo. Os dados elipsométricos em combinação com as imagens de AFM permitiram provar o aumento da espessura com o prolongamento da polimerização química, o que por sua vez afeta a deteção eletroquímica de espécies provenientes da catálise enzimática, para espessuras iguais ou superiores a 8 nm. Constatando ainda propriedades comparáveis em termos de hidrofiliabilidade ($\theta_c \approx 48^\circ$), rugosidade ($R_q \approx 3 \text{ nm}$) e recobrimento superficial de quinonas ($\Gamma \approx 3 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$), para filmes crescidos de polimerização curta (1 h) ou longa (8 e 14 h), tornou-se evidente que filmes finos ($3 \pm 1 \text{ nm}$) são adequados à deteção amperométrica dessas espécies. Por este motivo a posterior imobilização de lacase e nanopartículas seguiram este princípio. Suspeita-se que uma otimização da catálise e da resposta eletroquímica de filmes polimerizados em intervalos de curta duração (até 2 h) seria pautada por dificuldades no controlo rigoroso da espessura. Neste ponto, a eletropolimerização da dopamina é uma alternativa de síntese com potencial no controlo rigoroso das propriedades de filmes com pouca espessura. Para além da maior rapidez de síntese comparativamente ao método químico, a aplicação de um potencial oxidativo poderá permitir controlar o estado de oxidação do filme, maximizando a quantidade de quinonas disponíveis à imobilização de lacase e nanopartículas. Recorrendo a técnicas espectrofotométricas de caracterização como a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia de fotoeletrões de raios-X (XPS), poder-se-ia comprovar o controlo da química superficial do filme, assim como tentar clarificar vários aspetos da ligação química PDA-lacase e PDA-NPs. A porosidade e resistividade são igualmente cruciais para uma resposta sensível da superfície, e poderiam ser avaliados por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) permitindo, em combinação com a voltametria, uma caracterização muito completa dos filmes de polidopamina.
- 2) No capítulo 4 ficou demonstrada a capacidade da polidopamina em imobilizar lacase ($K_M = 35,5 \text{ } \mu\text{M}$) preservando e estabilizando a sua atividade catalítica comparativamente a uma superfície não modificada de grafite ($K_M = 130 \text{ } \mu\text{M}$). Apesar da imobilização ter ocorrido sobre um filme previamente formado de modo a evitar processos de aprisionamento ou encapsulamento, especula-se que a rugosidade inicial da grafite tenha proporcionado a formação de interações fracas PDA-lacase resultando numa maior atividade no primeiro ensaio relativamente aos seguintes. Os mecanismos pelos quais o material proteico é imobilizado na polidopamina não se encontram reportados na literatura a um nível fundamental. Para melhor

elucidação acerca das interações PDA-Lac, os ensaios deveriam ser igualmente efetuados utilizando substratos mais lisos que a grafite (por ex. GC ou HOPG), complementado a informação catalítica com ensaios de adsorção na Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM). Uma vez conhecida a contribuição da rugosidade para a adsorção de lacase, poder-se-á então melhorar a estabilidade operacional do eletrodo introduzindo, por exemplo, uma arquitetura de camadas alternadas (*layer-by-layer*, LbL) entre PDA e lacase. Outra importante conclusão deste capítulo, consiste na constatação de uma melhor afinidade enzima-substrato da grafite/ePDA/Lac ($K_M = 19,8 \mu\text{M}$) comparativamente à grafite/PDA/Lac ($K_M = 35,5 \mu\text{M}$). Como referido no ponto anterior, o melhor conhecimento das propriedades dos filmes eletrossintetizados (composição, porosidade, condutividade) poderá explicar esta diferença e possibilitará o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficazes de modificação de eletrodo.

- 3) Por último, no capítulo 5 verificou-se a importância da proteção prévia das nanopartículas e os seus efeitos na deteção amperométrica do ABTS na presença e ausência de enzima. Neste momento importa referir que a polidopamina demonstrou ser um material versátil que protege, funcionaliza e imobiliza nanopartículas. No que toca aos efeitos das Fe_3O_4 -NPs, verificou-se não só um aumento da sensibilidade da PDA após modificação com PDA@NPs ($17 \text{ mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$) como também se verificaram melhorias apreciáveis na afinidade enzimática dos conjugados Lac&PDA@NPs ($K_M = 1 \mu\text{M}$) e do eletrodo grafite/PDA+Lac+Lac&PDA@NPs ($K_M = 10,6 \mu\text{M}$). Apesar da lacuna atual no entendimento das propriedades catalíticas da magnetite nanoestruturada, apresentou-se neste documento um resultado preliminar que exclui a área superficial como único fator relevante. Ensaio voltamétricos e potenciométricos convencionais poderão ser empregues para desvendar a cinética e mecanismo da oxidação do ABTS, ou eventualmente, de substratos fenólicos, na presença de tais nanoestruturas. O mesmo deverá ser investigado sobre a catálise enzimática e comprovar a imobilização das nanopartículas por microscopia de força atômica (AFM) em superfícies lisas e/ou por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS). Para além do conhecimento fundamental adquirido acerca das nanopartículas, foram exploradas diferentes arquiteturas de eletrodo que influenciaram os desempenhos catalíticos finais. Como passos decisivos destacam-se a conjugação NPs-lacase que permitiu melhorar a afinidade, e a imobilização simultânea à polimerização que permitiu maximizar as quantidades imobilizadas. Sugerem-se como melhorias futuras a utilização de polidopamina eletrossintetizada – onde poder-se-ão introduzir outros monómeros de catecolamina (DOPA, epinefrina, etc) ou monómeros de polímeros condutores (por ex. tiofeno) – e o recurso a metodologias baseadas na imobilização por ímãs tirando partido das propriedades magnéticas das NPs.

Graças à complementaridade das técnicas de caracterização utilizadas, tornou-se possível determinar variadas propriedades da química e física interfacial de eletrodos modificados com PDA, lacase e NPs de magnetite. Com a versatilidade da polidopamina dirigida a várias arquiteturas de eletrodo, aliada à especificidade catalítica da lacase e aos efeitos eletroquímicos das nanopartículas, preparou-se um eletrodo de alta sensibilidade o que denota a importância em aplicar novos materiais aos biossensores enzimáticos. O avanço destes dispositivos enquanto ferramentas analíticas rápidas e fiáveis dependerá fortemente do conhecimento científico fundamental sobre o funcionamento destes sistemas, assim como da viabilidade das metodologias de modificação futuras e atuais.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

7. Referências bibliográficas

- [1] S. Alegret, A. Merkoçi, *Comprehensive Analytical Chemistry – Electrochemical Sensor Analysis*, Volume 49, **2007**, Elsevier, Netherlands.
- [2] M. M. Rodríguez-Delgado, G. S. Alemán-Nava, J. M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martínez-Chapa, D. Barceló, R. Parra, Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds, *Trends in Analytical Chemistry*, **2015**, 74, 21–45.
- [3] A. Soto-Vaca, A. Gutierrez, J. N. Losso, Z. Xu, J. W. Finley, Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 6658–6677.
- [4] A. Escarpa, M. C. Gonzalez, An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2001**, 31 (2), 57–139.
- [5] J. S. Jensen, S. Demiray, M. Egebo, A. S. Meyer, Prediction of Wine Color Attributes from the Phenolic Profiles of Red Grapes (*Vitis vinifera*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56 (3), 1105–1115.
- [6] F. Paiva-Martins, R. Correia, S. Félix, P. Ferreira, M. H. Gordon, Effects of Enrichment of Refined Olive Oil with Phenolic Compounds from Olive Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 4139–4143.
- [7] P. Ambigaipalan, A. C. Camargo, F. Shahidi, Phenolic Compounds of Pomegranate Byproducts (Outer Skin, Mesocarp, Divider Membrane) and Their Antioxidant Activities, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2016**, 64, 6584–6604.
- [8] M. Sanz, E. Cadahía, E. Esteruelas, A. M. Muñoz, B. F. Simón, T. Hernández, I. Estrella, Phenolic Compounds in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 9631–9640.
- [9] J. Valente, Subprodutos Alimentares: Novas Alternativas e Possíveis Aplicações Farmacêuticas, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa*, Porto, **2015**.
- [10] W. Zheng, S. Y. Wang, Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5165–5170.
- [11] T. D. Cuong, T. M. Hung, J. C. Kim, E. H. Kim, M. H. Woo, J. S. Choi, J. H. Lee, B. S. Min, Phenolic Compounds from *Caesalpinia sappan* Heartwood and Their Anti-inflammatory Activity, *Journal of Natural Products*, **2012**, 75, 2069–2075.
- [12] Q. Hu, B. Zhou, J. Huang, X. Gao, L. Shu, G. Yang, C. Che, Antiviral Phenolic Compounds from *Arundina graminifolia*, *Journal of Natural Products*, **2013**, 76, 292–296.
- [13] V. Kuete, A. T. Mbaveng, E. C. N. Nono, C. C. Simo, M. Zeino, A. E. Nkengfack, T. Efferth, Cytotoxicity of seven naturally occurring phenolic compounds towards multi-factorial drug-resistant cancer cells, *Phytomedicine*, **2016**, 23, 856–863.
- [14] M. Montaña, A. C. Gutleb, A. J. Murk, Persistent Toxic Burdens of Halogenated Phenolic Compounds in Humans and Wildlife, *Environmental Science and Technology*, **2013**, 47, 6071–6081.
- [15] T. F. T. Omar, A. Ahmad, A. Z. Aris, F. M. Yusoff, Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds, *Trends in Analytical Chemistry*, **2016**, 85, 241–259.

- [16] J. Davis, D. H. Vaughan, M. F. Cardosi, Elements of biosensor construction, *Enzyme and Microbial Technology*, **1995**, 17 (12), 1030–1035.
- [17] M. Marco, D. Barceló, Environmental applications of analytical biosensors, *Measurement Science and Technology*, **1996**, 7 (11), 1547–1562.
- [18] C. C. Adley, Past, Present and Future of Sensors in Food Production, *Foods*, **2014**, 3, 491–510.
- [19] R. F. Taylor, J. S. Schultz, Handbook of Chemical and Biological Sensors, **1996**, Institute of Physics Publishing, Bristol, United Kingdom.
- [20] M. Fernández-Fernández, M. A. Sanromán, D. Moldes, Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances*, **2013**, 31, 1808–1825.
- [21] R. S. Freire, N. Durán, L. T. Kubota, Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for the determination of phenolic compounds and its application for monitoring remediation, *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 463 (2), 229–238.
- [22] P. Baldrian, Fungal laccases – occurrence and properties, *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, **2006**, 30 (2), 215–242.
- [23] S. Shleeva, J. Tkaca, A. Christensona, T. Ruzgasa, A. I. Yaropolovb, J. W. Whittakerd, L. Gorton, Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 20, 2517–2554.
- [24] N. Durán, M. A. Rosa, A. D’Annibale, L. Gianfreda, Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, **2002**, 31 (7), 907–931.
- [25] L. Pourcel, J. Routaboul, V. Cheynier, L. Lepiniec, I. Debeaujon, Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions, *Trends in Plant Science*, **2007**, 12 (1), 29–36.
- [26] J. Abdullah, M. Ahmad, L. Y. Heng, N. Karuppiah, H. Sidek, An Optical Biosensor based on Immobilization of Laccase and MBTH in Stacked Films for the Detection of Catechol, *Sensors*, **2007**, 7, 2238–2250.
- [27] M. Portaccio, S. Martino, P. Maiuri, D. Durante, P. Luca, M. Lepore, U. Bencivenga, S. Rossi, A. Maioc, D. G. Mita, Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2006**, 41, 97–102.
- [28] M. Solís-Oba, V. M. Ugalde-Saldívar, I. González, G. Viniegra-González, An electrochemical–spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2’-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2005**, 579 (1), 59–66.
- [29] C. Fernández-Sánchez, T. Tzanov, G. M. Gübitz, A. Cavaco-Paulo, Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry*, **2002**, 58 (2), 149–156.
- [30] S. Riva, Laccases: blue enzymes for green chemistry, *Trends in Biotechnology*, **2006**, 24 (5), 219–226.
- [31] J. B. Beilen, Z. Li, Enzyme technology: an overview, *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, 13, 338–344.
- [32] D. N. Tran, K. J. Balkus, Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes, *American Chemical Society Catalysis*, **2011**, 1, 956–968.
- [33] L. Cao, Immobilised enzymes: science or art?, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2005**, 9, 217–226.

- [34] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, 40, 1451–1463.
- [35] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, P. B. Messersmith, Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings, *Science*, **2007**, 318, 426–430.
- [36] Y. Liu, K. Ai, L. Lu, Polydopamine and Its Derivative Materials: Synthesis and Promising Applications in Energy, Environmental, and Biomedical Fields, *American Chemical Society Chemical Reviews*, **2014**, 114, 5057–5115.
- [37] M. E. Lynge, P. Schattling, B. Städler, Recent developments in poly(dopamine)-based coatings for biomedical applications, *Nanomedicine*, **2015**, 10 (17), 2725–2742.
- [38] L. Li, H. Zeng, Marine mussel adhesion and bio-inspired wet adhesives, *Biotribology*, **2016**, 5, 44–51.
- [39] J. H. Waite, M. L. Tanzer, Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline, *Science*, **1981**, 212 (4498), 1038–1040.
- [40] M. d’Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella, P. Meredith, T. Sarna, Chemical and Structural Diversity in Eumelanins: Unexplored Bio-Optoelectronic Materials, *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48 (22), 3914–3921.
- [41] N. F. D. Vecchia, R. Avolio, M. Alfè, M. E. Errico, A. Napolitano, M. d’Ischia, Building-Block Diversity in Polydopamine Underpins a Multifunctional Eumelanin-Type Platform Tunable Through a Quinone Control Point, *Advanced Functional Materials*, **2013**, 23, 1331–1340.
- [42] M. d’Ischia, A. Napolitano, V. Ball, C. Chen, M. J. Buehler, Polydopamine and Eumelanin: From Structure–Property Relationships to a Unified Tailoring Strategy, *Accounts of Chemical Research*, **2014**, 47, 3541–3550.
- [43] D. R. Dreyer, D. J. Miller, B. D. Freeman, D. R. Paul, C. W. Bielawski, Elucidating the Structure of Poly(dopamine), *Langmuir*, **2012**, 28, 6428–6435.
- [44] J. Jiang, L. Zhu, L. Zhu, B. Zhu, Y. Xu, Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films, *Langmuir*, **2011**, 27, 14180–14187.
- [45] Y. Ding, L. Weng, M. Yang, Z. Yang, X. Lu, N. Huang, Y. Leng, Insights into the Aggregation/Deposition and Structure of a Polydopamine Film, *Langmuir*, **2014**, 30, 12258–12269.
- [46] E. Faure, C. Falentin-Daudré, C. Jérôme, J. Lyskawa, D. Fournier, P. Woisel, C. Detrembleur, Catechols as versatile platforms in polymer chemistry, *Progress in Polymer Science*, **2013**, 38, 236–270.
- [47] H. Lee, J. Rho, P. B. Messersmith, Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings, *Advanced Materials*, **2009**, 21, 431–434.
- [48] L. Zhu, J. Jiang, B. Zhu, Y. Xu, Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2011**, 86, 111–118.
- [49] M. Richter, C. Schulenburg, D. Jankowska, T. Heck, G. Faccio, Novel materials through Nature’s catalysts, *Materials Today*, **2015**, 18 (8), 459–467.
- [50] L. Q. Xu, W. J. Yang, K. Neoh, E. Kang, G. D. Fu, Dopamine-Induced Reduction and Functionalization of Graphene Oxide Nanosheets, *Macromolecules*, **2010**, 43, 8336–8339.

- [51] F. Bernsmann, J. Voegel, V. Ball, Different synthesis methods allow to tune the permeability and permselectivity of dopamine–melanin films to electrochemical probes, *Electrochimica Acta*, **2011**, 56 (11) 3914–3919.
- [52] Y. Li, M. Liu, C. Xiang, Q. Xie, S. Yao, Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions, *Thin Solid Films*, **2006**, 497, 270 – 278.
- [53] W. Shi, H. Jiang, Y. Sun, X. Liu, X. Zhang, Z. Sun, L. Dai, D. Ge, One-pot preparation of glucose biosensor based on polydopamine–graphene composite film modified enzyme electrode, *Sensors and Actuators B*, **2013**, 177, 826– 832.
- [54] J. Wang, B. Li, Z. Li, K. Ren, L. Jin, S. Zhang, H. Chang, Y. Sun, J. Ji, Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents, *Biomaterials*, **2014**, 35, 7679–7689.
- [55] E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, P. Herrasti, M. García-Hernández, A. Muñoz-Bonilla, One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles, *RSC Advances*, **2014**, 4 (89), 48353–48361.
- [56] S. Cosnier, A. Karyakin, Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications, **2010**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- [57] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, W. Kim, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, **2015**, 16 (2).
- [58] R. L. Rebodos, P. J. Vikesland, Effects of Oxidation on the Magnetization of Nanoparticulate Magnetite, *Langmuir*, **2010**, 26 (22), 16745–16753.
- [59] R. M. Cornell, U. Schwertmann, The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, Second Edition, **2003**, Darmsstadt, Germany.
- [60] D. K. Kim, M. Mikhaylova, Y. Zhang, M. Muhammed, Protective Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Chemistry of Materials*, **2003**, 15 (8), 1617-1627.
- [61] S. Behrens, Preparation of functional magnetic nanocomposites and hybrid materials: recent progress and future directions, *Nanoscale*, **2011**, 3, 877–892.
- [62] M. B. Gawande, P. S. Branco, R. S. Varma, Nano-magnetite (Fe₃O₄) as a support for recyclable catalysts in the development of sustainable methodologies, *Chemical Society Reviews*, **2013**, 42, 3371–3393.
- [63] S. Ding, A. A. Cargill, I. L. Medintz, J. C. Claussen, Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation, *Current Opinion in Biotechnology*, **2015**, 34, 242–250.
- [64] I. Almeida, S. G. Mendo, M. D. Carvalho, J. P. Correia, A. S. Viana, Catalytic Co and Fe porphyrin/Fe₃O₄ nanoparticles assembled on gold by carbon disulfide, *Electrochimica Acta*, **2016**, 188, 1–12.
- [65] C. Johannes, A. Majcherczyk, Laccase activity tests and laccase inhibitors, *Journal of Biotechnology*, **2000**, 78 (2), 193–199.
- [66] R. L. McCreery, Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry, *ACS Chemical Reviews*, **2008**, 108 (7), 2646–2687.
- [67] J. Zhou, D. O. Wipf, UV/ozone pretreatment of glassy carbon electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2001**, 499 (1), 121–128.

- [68] M. D. Carvalho, F. Henriques, L. P. Ferreira, M. Godinho, M. M. Cruz, Iron oxide nanoparticles: the Influence of synthesis method and size on composition and magnetic properties, *Journal of Solid State Chemistry*, **2013**, 201, 144–152.
- [69] I. Almeida, F. Henriques, M. D. Carvalho, A. S. Viana, Carbon disulfide mediated self-assembly of Laccase and iron oxide nanoparticles on gold surfaces for biosensing applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2017**, 485, 242–250.
- [70] M. Losurdo, K. Hingerl, *Ellipsometry at the Nanoscale*, **2013**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- [71] R. M. A. Azzam, N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, North-Holland, **1977**, Netherlands.
- [72] H. Fujiwara, *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*, **2007**, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- [73] K. Hinrichs, K. Eichhorn, *Ellipsometry of Functional Organic Surfaces and Films*, Springer Series in Surface Sciences, Volume 52, **2014**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- [74] G. Bracco, B. Holst, *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences, Volume 51, **2013**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- [75] F. Mussano, T. Genova, S. Guastella, M. G. Faga, S. Carossa, Possible Role of Microcrystallinity on Surface Properties of Titanium Surfaces for Biomedical Application, INTECH Open, disponível em <http://dx.doi.org/10.5772/62914>, acessado a 10/2016.
- [76] J. Drelich, J. S. Laskowski, K. L. Miffal, *Apparent and Microscopic Contact Angles*, **2000**, VSP BV, Netherlands.
- [77] A. R. Balkenende, H. J. A. P. van de Boogaard, M. Scholten, N. P. Willard, Evaluation of Different Approaches To Assess the Surface Tension of Low-Energy Solids by Means of Contact Angle Measurements, *Langmuir*, **1998**, 14 (20), 5907-5912.
- [78] A. F. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri, P. Hoffmann, A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, **2006**, 286, 92–103.
- [79] B. Voigtländer, *Scanning Probe Microscopy – Atomic Force Microscopy and Scanning Tunneling Microscopy*, Springer series in NanoScience and Technology, **2015**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- [80] S. N. Magonov, M. Whangbo, *Surface Analysis with STM and AFM – Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis*, VCH Publishers, **1996**, Germany.
- [81] D. L. Sedin, K. L. Rowlen, Influence of tip size on AFM roughness measurements, *Applied Surface Science*, **2001**, 182, 40-48.
- [82] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, Second Edition, **2001**, John Wiley & Sons, U.S.A.
- [83] D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 89th Edition, **2009**, CRC Press/Taylor and Francis, Florida, U.S.A.
- [84] C. G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, First Edition, **2007**, Elsevier, Netherlands.
- [85] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Second Edition, **2000**, Wiley-VCH, Germany.
- [86] R. A. Zangmeister, T. A. Morris, M. J. Tarlov, Characterization of Polydopamine Thin Films Deposited at Short Times by Autoxidation of Dopamine, *Langmuir*, **2013**, 29 (27), 8619–8628.

- [87] F. Bernsmann, A. Ponche, C. Ringwald, J. Hemmerlé, J. Raya, B. Bechinger, J. Voegel, P. Schaaf, V. Ball, Characterization of Dopamine-Melanin Growth on Silicon Oxide, *The Journal of Physical Chemistry C*, **2009**, 113 (19), 8234–8242.
- [88] V. Ball, D. D. Frari, V. Toniazio, D. Ruch, Kinetics of polydopamine film deposition as a function of pH and dopamine concentration: Insights in the polydopamine deposition mechanism, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2012**, 386 (1), 366–372.
- [89] W. Zheng, H. Fan, L. Wang, Z. Jin, Oxidative Self-Polymerization of Dopamine in an Acidic Environment, *Langmuir*, **2015**, 31 (42), 11671–11677.
- [90] F. Ponzio, V. Balla, Persistence of dopamine and small oxidation products thereof in oxygenated dopamine solutions and in “polydopamine” films, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **2014**, 443, 540–543.
- [91] J. Jiang, L. Zhu, X. Li, Y. Xu, B. Zhu, Surface modification of PE porous membranes based on the strong adhesion of polydopamine and covalent immobilization of heparin, *Journal of Membrane Science*, **2010**, 364, 194–202.
- [92] Q. Wei, B. Li, N. Yi, B. Su, Z. Yin, F. Zhang, J. Li, C. Zhao, Improving the blood compatibility of material surfaces via biomolecule-immobilized mussel-inspired coatings, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2010**, 96A (1), 38–45.
- [93] B. Zhu, S. Edmondson, Polydopamine-melanin initiators for Surface-initiated ATRP, *Polymer*, **2011**, 52 (10), 2141–2149.
- [94] H. Wei, J. Ren, B. Han, L. Xu, L. Han, L. Jia, Stability of polydopamine and poly(DOPA) melanin-like films on the surface of polymer membranes under strongly acidic and alkaline conditions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2013**, 110, 22–28.
- [95] T. Wu, J. Hong, Dopamine-Melanin Nanofilms for Biomimetic Structural Coloration, *Biomacromolecules*, **2015**, 16 (2), 660–666.
- [96] A. Dekanskia, J. Stevanovic, R. Stevanovic, B. Z. Nikolic, V. M. Jovanovic, Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation, *Carbon*, **2001**, 39 (8), 1195–1205.
- [97] F. Barrière, A. J. Downard, Covalent modification of graphitic carbon substrates by non-electrochemical methods, *Journal of Solid State Electrochemistry*, **2008**, 12 (10), 1231–1244.
- [98] C. Barbero, R. Kötz, Electrochemical Activation of Glassy Carbon – Spectroscopic Ellipsometry of Surface Phase Formation, *Journal of The Electrochemical Society*, **1993**, 140 (1), 1–6.
- [99] K. Yokoyama, Y. Kayanuma, Cyclic Voltammetric Simulation for Electrochemically Mediated Enzyme Reaction and Determination of Enzyme Kinetic Constants, *Analytical Chemistry*, **1998**, 70 (16), 3368–3376.
- [100] G. M. Jenkins, K. Kawamura, Structure of Glassy Carbon, *Nature*, **1971**, 231, 175–176.
- [101] E. Yasuda, M. Inagaki, K. Kaneko, M. Endo, A. Oya, Y. Tanabe, Carbon Alloys: Novel Concepts To Develop Carbon Science And Technology, First Edition, **2003**, Elsevier, Netherlands.
- [102] F. Bernsmann, V. Ball, F. Addiego, A. Ponche, M. Michel, J. J. A. Gracio, V. Toniazio, D. Ruch, Dopamine-Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution, *Langmuir*, **2011**, 27 (6), 2819–2825.
- [103] V. Ball, Determination of the extinction coefficient of “polydopamine” films obtained by using NaIO₄ as the oxidant, *Materials Chemistry and Physics*, **2017**, 186, 546–551.
- [104] D. J. Brink, N. G. van der Berg, Structural colours from the feathers of the bird *Bostrychia hagedash*, *Journal of Physics D: Applied Physics*, **2004**, 37 (5), 813–818.

- [105] A. Nakao, M. Iwaki, Y. Yokoyama, Potassium ion implantation into glassy carbon, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **2003**, 206, 211–214.
- [106] D. Deletioğlu, E. Hasdemir, A. O. Solak, Z. Üstündağ, R. Güzel, Preparation and characterization of poly(indole-3-carboxaldehyde) film at the glassy carbon surface, *Thin Solid Films*, **2010**, 519 (2), 784–789.
- [107] D. Uzun, H. Arslan, A. B. Gündüzalp, E. Hasdemir, Preparation of modified glassy carbon surface with N-(1-H-indole-3yl)methylene thiazole-2-amine and its characterization, *Surface & Coatings Technology*, **2014**, 239, 108–115.
- [108] S. Chen, Y. Cao, J. Feng, Polydopamine As an Efficient and Robust Platform to Functionalize Carbon Fiber for High-Performance Polymer Composites, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2014**, 6 (1), 349–356.
- [109] G. E. Jellison, J. D. Hunn, H. N. Lee, Measurement of optical functions of highly oriented pyrolytic graphite in the visible, *Physical Review B*, **2007**, 76, 085125.
- [110] M. Amiri, E. Amali, A. Nematollahzadeh, H. Salehniya, Poly-dopamine films: Voltammetric sensor for pH monitoring, *Sensors and Actuators B*, **2016**, 228, 53–58.
- [111] X. Wang, B. Jin, x. Lin, In-situ FTIR Spectroelectrochemical Study of Dopamine at Glassy carbon Electrode in a Neutral Solution, *Analytical Sciences*, **2002**, 18 (8), 931–933.
- [112] J. Di, S. Bi, Effect of aluminum (III) on the conversion of dopachrome in the melanin synthesis pathway, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2003**, 59 (8), 1689–1696.
- [113] M. D. Hawley, S. V. Tatawawadi, S. Piekarski, R. N. Adarns, Electrochemical Studies of the Oxidation Pathways of Catecholamines, *Journal of the American Chemical Society*, **1967**, 89 (2), 447–450.
- [114] S. Gidanian, P. J. Farmer, Redox behavior of melanins: direct electrochemistry of dihydroxyindole-melanin and its Cu and Zn adducts, *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2002**, 89, 54–60.
- [115] Y. Li, Y. Tana, W. Denga, Q. Xiea, Y. Zhanga, J. Chenb, S. Yao, Electropolymerization of catecholamines after laccase-catalyzed preoxidation to efficiently immobilize glucose oxidase for sensitive amperometric biosensing, *Sensors and Actuators B*, **2010**, 151 (1), 30–38.
- [116] F. Zhang, G. Dryhurst, Oxidation Chemistry of Dopamine: Possible Insights into the Age-Dependent Loss of Dopaminergic Nigrostriatal Neurons, *Bioorganic Chemistry*, **1993**, 21 (4), 392–410.
- [117] P. S. Guin, S. Das, P. C. Mandal, Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review, *International Journal of Electrochemistry*, **2011**, 816202.
- [118] C. G. Chavdarian, D. Karashima, N. Castagnoli, Oxidative and Cardiovascular Studies on Natural and Synthetic Catecholamines, *ACS Journal of Medicinal Chemistry*, **1978**, 21 (6), 548–554.
- [119] I. Ismaila, T. Okajimaa, S. Kawauchib, T. Ohsaka, Studies on the early oxidation process of dopamine by electrochemical measurements and quantum chemical calculations, *Electrochimica Acta*, **2016**, 211, 777–786.
- [120] T. E. Young, B. W. Babbitt, Electrochemical Study of the Oxidation of α -Methyldopamine, α -Methylnoradrenaline, and Dopamine, *The Journal of Organic Chemistry*, **1983**, 48 (4), 562–566.

- [121] H. Muguruma, Y. Inoue, H. Inoue, T. Ohsawa, Electrochemical Study of Dopamine at Electrode Fabricated by Cellulose-Assisted Aqueous Dispersion of Long-Length Carbon Nanotube, *The Journal of Physical Chemistry C*, **2016**, 120 (22), 12284–12292.
- [122] C. Léger, P. Bertrand, Direct Electrochemistry of Redox Enzymes as a Tool for Mechanistic Studies, *ACS Chemical Reviews*, **2008**, 108 (7), 2379–2438.
- [123] C. Léger, S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, F. A. Armstrong, Enzyme Electrokinetics: Using Protein Film Voltammetry To Investigate Redox Enzymes and Their Mechanisms, *ACS Biochemistry*, **2003**, 42 (29), 8653–8662.
- [124] N. J. Christensen, K. P. Kepp, Setting the stage for electron transfer: Molecular basis of ABTS-binding to four laccases from *Trametes versicolor* at variable pH and protein oxidation state, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2014**, 100, 68–77.
- [125] T. L. Toulas, C. P. Kitsos, Estimation Aspects Of The Michaelis–Menten Model, *REVSTAT Statistical Journal*, **2016**, 14 (2), 101–118.
- [126] O. Moe, R. Cornelius, Enzyme Kinetics, *ACS Journal of Chemical Education*, **1988**, 65 (2), 137–141.
- [127] B. Haghighi, L. Gorton, T. Ruzgas, L. J. Jönsson, Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis, *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 487 (1), 3–14.
- [128] F. Xu, Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases, *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272 (2), 924–928.
- [129] L. C. Almeida, Desenvolvimento de uma Célula de Biocombustível Baseada em Eléttodos Modificados por Polidopamina, Tese de Licenciatura em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, **2014**.
- [130] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biochemistry, 5th Edition, **2002**, W. H. Freeman, U. S. A.
- [131] A. Jarosz-Wilkolazkaa, T. Ruzgasb, L. Gorton, Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure, *Talanta*, **2005**, 66 (5), 1219–1224.
- [132] D. Quan, Y. Kim, K. B. Yoon, W. Shin, Assembly of Laccase over Platinum Oxide Surface and Application as an Amperometric Biosensor, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2002**, 23 (3), 385–390.
- [133] R. Eiseenthal, M. J. Danson, D. W. Hough, Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator?, *Trends in Biotechnology*, **2007**, 25 (6), 247–249.
- [134] L. Yang, X. Ren, F. Tang, L. Zhang, A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafton composite film, *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 25 (4), 889–895.
- [135] J. Hrbac, V. Halouzka, R. Zboril, K. Papadopoulos, T. Triantis, Carbon Electrodes Modified by Nanoscopic Iron(III) Oxides to Assemble Chemical Sensors for the Hydrogen Peroxide Amperometric Detection, *Electroanalysis*, **2007**, 19 (17), 1850–1854.
- [136] R. Liu, Y. Guo, G. Odusote, F. i Qu, R. D. Priestley, Core–Shell Fe₃O₄ Polydopamine Nanoparticles Serve Multipurpose as Drug Carrier, Catalyst Support and Carbon Adsorbent, *ACS Applied Materials and Interfaces*, **2013**, 5 (18), 9167–9171.
- [137] J. Si, H. Yang, Preparation and characterization of bio-compatible Fe₃O₄@Polydopamine spheres with core/shell nanostructure, *Materials Chemistry and Physics*, **2011**, 128 (3), 519–524.

- [138] S. Zhanga, Y. Zhanga, G. Bib, J. Liua, Z. Wang, Q. Xua, H. Xua, X. Li, Mussel-inspired polydopamine biopolymer decorated with magnetic nanoparticles for multiple pollutants removal, *Journal of Hazardous Materials*, **2014**, 270, 27–34.
- [139] W. J. Barreto, S. Ponzoni, P. Sassi, A Raman and UV-Vis study of catecholamines oxidized with Mn(III), *Spectrochimica Acta Part A*, **1999**, 55 (1), 65–72.
- [140] Y. P. He, Y. M. Miao, C. R. Li, S. Q. Wang, L. Cao, S. S. Xie, G. Z. Yang, B. S. Zou, Size and structure effect on optical transitions of iron oxide nanocrystals, *Physical Review B*, **2005**, 71 (12), 125411.
- [141] J. Tang, M. Myers, K. A. Bosnick, L. E. Brus, Magnetite Fe₃O₄ Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics, *ACS The Journal of Physical Chemistry B*, **2003**, 107 (30), 7501–7506.
- [142] Y. A. Barnakov, B. L. Scott, V. Golub, L. Kelly, V. Reddy, K. L. Stokes, Spectral dependence of Faraday rotation in magnetite-polymer nanocomposites, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **2004**, 65 (5), 1005–1010.
- [143] M. J. Sever, J. J. Wilker, Visible absorption spectra of metal–catecholate and metal–tironate complexes, *Dalton Transactions*, **2004**, (7), 1061–1072.
- [144] G. H. Hwang, K. H. Min, H. J. Lee, H. Y. Nam, G. H. Choi, B. J. Kim, S. Y. Jeonga, S. C. Lee, pH-Responsive robust polymer micelles with metal–ligand coordinated core cross-links, *RSC Chemical Communications*, **2014**, 50, 4351–4353.
- [145] N. González-Diéguez, A. Colina, J. López-Palacios, A. Heras, Spectroelectrochemistry at Screen-Printed Electrodes: Determination of Dopamine, *ACS Analytical Chemistry*, **2012**, 84 (21), 9146–9153.
- [146] S. L. Scott, W. Chen, A. Bakac, J. H. Espenson, Spectroscopic Parameters, Electrode Potentials, Acid Ionization Constants, and Electron Exchange Rates of the 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) Radicals and Ions, *ACS The Journal of Physical Chemistry*, **1993**, 97 (25), 6710–6714.
- [147] S. Kobayashi, A. Makino, Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry, *ACS Chemical Reviews*, **2009**, 109 (11), 5288–5353.
- [148] J. Jeon, T. T. Le, Y. Chang, Dihydroxynaphthalene-based mimicry of fungal melanogenesis for multifunctional coatings, *Microbial Biotechnology*, **2016**, 9 (3), 305–315.
- [149] R. Ikeda, H. Uyama, S. Kobayashi, Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid, *ACS Macromolecules*, **1996**, 29 (8), 3053–3054.